

**Molekulare und physiologische Charakterisierung des  
Energiestoffwechsels von *Nitrosomonas europaea***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Dipl. Biochem.

**Stefan Gilch**

aus Straubing

Bayreuth, 2009



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2005 bis Juli 2009 an der Universität Bayreuth am Institut für Mikrobiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Ortwin Meyer angefertigt und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (Förderkennzeichen SCHM 1512/3-2).

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 28.07.2009

Erstgutachter: Prof. Dr. Ortwin Meyer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Franz X. Schmid

Mündliche Prüfung am: 25.01.2010





# DANKSAGUNG

Ich danke...

...meinem Doktorvater **Prof. Dr. Ortwin Meyer** für die Vergabe des Themas sowie für seine fachlich wie persönlich höchst kompetente Unterstützung und Betreuung.

...meinem Arbeitsgruppenleiter **Dr. Ingo Schmidt**, der mir die Promotion in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Besonders bedanke ich mich für die intensive Unterstützung in allen Phasen des Promotionsprozesses von der anfänglichen Themenvergabe bis hin zur abschließenden Disputation. Seine immer währende Bereitschaft zur Diskussion und Ratschläge in Theorie und Praxis haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

...der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

...allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern des Lehrstuhls für Mikrobiologie für ihre tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit, ihre stets freundliche und offene Art und Weise sowie für ihren Zusammenhalt in schweren Zeiten, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre: **Dr. Astrid Pelzman, Dr. Oliver Kress, Tobias Maisel, Sven Arnold, Matthias Schlotter, Jasmin Wickinghoff, Benjamin Neuhäuser, Helena Hetzelt, Kerstin Weidinger, Sonja Beyer, Manja Vogel, Stefanie Hager, Dr. Dilip Gadkari, und Prof. Dr. Franz Meußdoerffer.**

... **PD Dr. Vitali Svetlitchnyi** für seine unverzichtbare praktische und theoretische Unterstützung bei der ESR-Spektroskopie.

... **Sarah Nagy, Mark Dürr und Miriam Hammermeister** für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

...meiner Freundin **Jasmin Wickinghoff** für ihre ausdauernde Geduld und für ihre vielfältige Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

...meinen ehemaligen Studienkollegen **Benjamin Neuhäuser, Jochen Kaufmann, Mark Dürr, Norbert Rigo, Miriam Hammermeister, Stefan Ringlstetter, Ulrike Großkinsky und Michael Grote** für eine einmalige und zugleich unvergessliche Zeit in Bayreuth.

...ganz besonders meinen Eltern, **Paul und Waltraud Gilch**, für ihre moralische und finanzielle Unterstützung während meiner Ausbildung. Ihre vorgelebten Prinzipien sowie ihre Liebe haben mir stets Halt und Orientierung geboten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.



# INHALTSVERZEICHNIS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>  | <b>I</b>  |
| <b>1 Summary</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2 Zusammenfassung</b>  | <b>3</b>  |
| <b>3 Einleitung</b>   | <b>6</b>  |
| 3.1 Der biologische Stickstoffkreislauf   | 6         |
| 3.2 Systematik Ammoniak-oxidierender Bakterien  | 9         |
| 3.3 Energiestoffwechsel von <i>Nitrosomonas europaea</i>  | 11        |
| 3.4 Die Ammoniak-Monooxygenase  | 15        |
| 3.5 Fragestellung, Zielsetzung und Strategie der Arbeit   | 22        |
| <b>4 Synopsis</b>   | <b>25</b> |
| 4.1 Eine lösliche Form der AMO aus <i>N. europaea</i>   | 25        |
| 4.1.1 Molekulare Masse und Untereinheitenstruktur der löslichen AMO   | 28        |
| 4.1.2 Charakterisierung der Metallzentren   | 33        |
| 4.1.3 Identifikation der Acetylen-Bindungsstelle  | 41        |
| 4.1.4 Disproportionierung von Hydroxylamin durch die lösliche AMO   | 46        |
| 4.2 Aufnahme und Akkumulation des Substrates Ammoniak durch <i>N. europaea</i>  | 55        |
| 4.3 Transkriptionelle Regulation von Schlüsselenzymen des Energiestoffwechsels von <i>N. europaea</i> unter oxischen und anoxischen Bedingungen | 63        |
| 4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick   | 71        |
| <b>5 Literaturverzeichnis</b>   | <b>76</b> |

## Publikationen

105

- I) **Gilch, S.**, Meyer, O. & Schmidt, I. (2009) A soluble form of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *Biological Chemistry* published online 20.05.2009, DOI: 10.1515/BC.2009.085 107
- II) **Gilch, S.**, Vogel, M., Lorenz, M. W., Meyer, O. & Schmidt, I. (2009) Interaction of the mechanism-based inactivator acetylene with ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *Microbiology* 155, 279-284 137
- III) **Gilch, S.**, Meyer, O. & Schmidt, I. Electron paramagnetic studies of the copper and iron containing soluble ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. Submitted to *BioMetals* 145
- IV) Hetzelt, H., **Gilch, S.**, Meyer, O. & Schmidt, I. Hydroxylamine disproportion by soluble ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. Submitted to *Archives of Microbiology* 165
- V) Weidinger, K., Neuhäuser, B., **Gilch, S.**, Ludewig, U., Meyer, O. & Schmidt, I. (2007) Functional and physiological evidence for a Rhesus-type ammonia transporter in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiology Letters* 273, 260-267 187
- VI) Beyer, S., **Gilch, S.**, Meyer, O. & Schmidt, I. (2009) Transcription of genes coding for metabolic key functions in *Nitrosomonas europaea* during aerobic and anaerobic growth. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16, 187-197 197

## Erklärung

209

## Abkürzungsverzeichnis

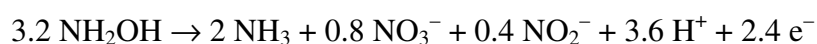
|                      |   |
|----------------------|---|
| <i>aceE</i>          | E1-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase   |
| AMO                  | Ammoniak-Monooxygenase  |
| Anammox              | Anaerobe Ammoniak Oxidation   |
| AOBs                 | Ammoniak-oxidierende Bakterien  |
| ATCC                 | American Type Culture Collection  |
| BN                   | Blue native   |
| BSA                  | Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)   |
| <i>cbbL</i>          | Große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase               |
| <i>coxA</i>          | Untereinheit I der Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase                                     |
| DT                   | Dithionit   |
| EDTA                 | Etyhlendiamintetraacetat  |
| ESR                  | Elektronspinresonanz  |
| <i>ftsZ</i>          | Zellteilungsprotein der FtsZ:Tubulin/FtsZ-Familie                                   |
| <i>gltA</i>          | Citrat-Synthase   |
| HAO                  | Hydroxylamin-Oxidoreduktase   |
| HPLC                 | High performance liquid chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie) |
| ICM                  | Intracytoplasmatisches Membransystem  |
| INT                  | Iodonitrotetrazoliumchlorid   |
| <i>ldhA</i>          | <i>D</i> -Laktat-Dehydrogenase  |
| <i>M. capsulatus</i> | <i>Methylococcus capsulatus</i>   |
| MA                   | Methylammonium  |
| MSF                  | L-Methioninsulfon   |
| MS                   | Massenspektrometrie   |
| Maldi-Tof            | Matrix assisted laser desorption ionization – Time of flight                        |
| <i>N. europaea</i>   | <i>Nitrosomonas europaea</i>  |
| <i>nsc</i>           | Nitrosocyanin   |
| NirK                 | Nitrit-Reduktase  |
| NOR                  | NO-Reduktase  |
| <i>odhA</i>          | E1-Untereinheit der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase                                     |
| PAGE                 | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| pMMO                 | Partikuläre Methan-Monooxygenase  |
| PMF                  | Proton motive force (Protonengradient)  |
| PMSF                 | Phenylmethylsulfonylfluorid   |
| <i>ppc</i>           | Phosphoenolpyruvat-Carboxylase  |
| <i>ppsA</i>          | Phosphoenolpyruvat-Synthase   |
| Rh1                  | Ammoniaktransporter von Rhesus-Typ  |
| RubisCO              | Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase                                      |
| SD                   | Standard deviation (Standardabweichung)   |
| SDS                  | Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)   |
| <i>sodB</i>          | Superoxid-Dismutase   |
| UV                   | Ultraviolett  |



## 1 Summary

For the first time a soluble functional form of ammonia monooxygenase (AMO) was described in *Nitrosomonas europaea* in addition to its membrane-bound form. Soluble and membrane-bound AMO occur in about the same amounts *in vivo* and both forms are catalytically active. Soluble AMO has a molecular mass of about 316 kDa and is a Cu-, Fe- (heme and non-heme Fe), and probably Zn-containing enzyme composed of the subunits AmoA (~27 kDa;  $\alpha$ -subunit), AmoB (~42 kDa;  $\beta$ -subunit), and cytochrome  $c_1$  (~24 kDa;  $\gamma$ -subunit) with an  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$  subunit arrangement. Soluble AMO contains  $9.5 \pm 1.0$  mol Cu (mol AMO)<sup>-1</sup>,  $3.9 \pm 0.7$  mol Fe (mol AMO)<sup>-1</sup>, and  $0.45 \pm 0.1$  to  $2.6 \pm 0.4$  mol Zn (mol AMO)<sup>-1</sup>. Upon reduction the visible absorption spectrum of AMO reveals absorption bands characteristic of cytochrome *c*. Electron paramagnetic resonance spectroscopy of air-oxidized AMO at 50 K shows a paramagnetic signal originating from Cu<sup>2+</sup> and at 10 K a paramagnetic signal characteristic of heme-Fe and non-heme-Fe, respectively. Comparison of EPR-detectable Cu<sup>2+</sup> with total copper determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) shows that there are six paramagnetic Cu<sup>2+</sup> and three diamagnetic Cu<sup>1+</sup> per heterotrimeric soluble AMO (two paramagnetic and one diamagnetic Cu per  $\alpha\beta\gamma$ -protomer). Inactivation of soluble AMO with acetylene did neither diminish the Fe-signals nor the intensity of the Cu-EPR signal. The observation that a 25 amino acid signal peptide is cleaved from the membrane-bound form of the enzyme, but not from the soluble form of AMO leads to the assumption that this N-terminal peptide alters folding of AMO resulting in a soluble and a membrane-bound conformation. The specific mechanism-based inactivator acetylene is oxidized by AMO to ketene which binds at His 191 of AmoA. Upon ketene binding one Cu<sup>1+</sup>-atom is liberated from the AmoA subunit. Apparently the combination of ketene binding and Cu<sup>1+</sup> liberation irreversibly inactivates AMO. The results give evidence that His 191 contributes to the coordination of an active Cu<sup>1+</sup> containing catalytic center involved in ammonia oxidation.

Soluble AMO catalyzes a disproportion of hydroxylamine to ammonia, nitrate, and nitrite according to following chemical equation:



The reaction has a temperature optimum at 45 to 50°C, a pH optimum at 8.5, and is not effected by light or oxygen. The maximum specific activity is about 1,000 nmol NH<sub>2</sub>OH

(mg AMO)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> and the  $K_m(\text{NH}_2\text{OH})$  value is about 140  $\mu\text{M}$ . Acetylene does not inhibit hydroxylamine disproportion, but hydrazine acts as competitive inhibitor of the enzyme. Hydroxylamine disproportion takes place in intact bacteria at increased hydroxylamine concentration and counteracts hydroxylamine accumulation during the sequential ammonia oxidation by AMO and hydroxylamine oxidoreductase. Hydroxylamine disproportion by soluble AMO might have its function as a mechanism to detoxify hydroxylamine and to partially regenerate the substrate ammonia. In this perspective, hydroxylamine disproportion contributes to a regulation of inorganic N-metabolism and energy conservation in *N. europaea*.

Furthermore, this study provides functional and physiological evidence for a Rhesus-type ammonia transporter (Rh1) in *N. europaea*. Rh1 supports ammonia as well as methylammonium (MA) uptake in the cytoplasm and the transport activities correlate with the Rh1 expression. The  $K_m$  value for the MA uptake is  $1.8 \pm 0.2$  mM (pH 7.25), and the uptake was competitively inhibited by ammonium [ $K_i(\text{NH}_4^+) = 0.3 \pm 0.1$  mM at pH 7.25]. Rh1 equilibrates the uncharged substrate species ( $\text{NH}_3$ ) and a low pH value (between 5 and 6) in the periplasmic space during ammonia oxidation seems to be responsible for the ammonium accumulation functioning as an acid  $\text{NH}_4^+$  trap.

The metabolism of *N. europaea* is flexible and allows them to grow under both oxic and anoxic conditions. In this work, the adaptation of the transcription to oxic and anoxic growth conditions was evaluated and the transcription of genes coding for metabolic key functions was analyzed. In aerobically ammonia-oxidizing cells of *N. europaea*, the specific activities of ammonia oxidation, nitrite reduction, and the growth rates correlated with the transcription level of the corresponding genes *amoA/hao/rh1*, *nirK/norB*, and *cbbL/ftsZ*. In anaerobically ammonia-oxidizing cells of *N. europaea*, the cellular mRNA concentrations of *amoA*, *hao*, *rh1*, *coxA*, *cbbL*, *ftsZ*, and *sodB* were reduced compared with aerobically nitrifying cells, but the mRNA levels of *nirK*, and *norB* were significantly increased. During anaerobic pyruvate-dependent denitrification, the mRNA abundance of *nirK*, *norB*, *aceE*, *gltA*, and *odhA* was increased, while the concentrations of *amoA*, *hao*, *rh1*, *coxA*, *cbbL*, *ftsZ*, and *sodB* were significantly reduced. Temperature, pH value, and  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}$ , and  $\text{NO}_2$  concentrations had comparatively small effects on the transcription of the studied genes.

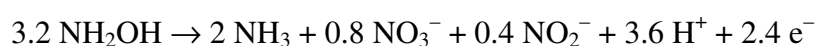


## 2 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmals eine funktionelle lösliche Ammoniak-Monooxygenase (AMO) aus *Nitrosomonas europaea* zu reinigen und zu charakterisieren. Die lösliche AMO ist dabei in ungefähr der gleichen Menge wie die membrangebundene AMO vorhanden. Beide Formen sind *in vivo* aktiv und besitzen eine ähnliche spezifische Aktivität. Die lösliche AMO ist ein Cu-, Fe- (sowohl Häm-gebundenes als auch nicht Häm-gebundenes Fe) und möglicherweise auch Zn-haltiges Enzym und besteht aus den Untereinheiten AmoA (~27 kDa;  $\alpha$ -Untereinheit), AmoB (~42 kDa;  $\beta$ -Untereinheit) und Cytochrom  $c_1$  (~24 kDa;  $\gamma$ -Untereinheit). Das Enzym weist dabei eine heterotrimere  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ -Untereinheitenstruktur mit einer molekularen Masse von etwa 316 kDa auf. Die AmoB-Untereinheit der löslichen AMO besitzt im Gegensatz zur membrangebundenen AMO eine Signalsequenz von 25 Aminosäuren. Die An- beziehungsweise Abwesenheit des Signalpeptides könnte die Konformation der AMO so weitreichend beeinflussen, dass daraus sowohl ein löslicher als auch ein membrangebundener AMO-Komplex resultiert. Das gereinigte Enzym koordiniert *in vitro*  $9,5 \pm 1,0$  mol Cu (mol AMO) $^{-1}$ ,  $3,9 \pm 0,7$  mol Fe (mol AMO) $^{-1}$  und  $0,45 \pm 0,1$  bis  $2,6 \pm 0,4$  mol Zn (mol AMO) $^{-1}$ . Nach Reduktion der löslichen AMO werden im Absorptionsspektrum die für Cytochrome des  $c$ -Typs charakteristischen Absorptionsbanden ersichtlich. Elektronenspinresonanz-Spektren von luftoxidierten löslichen AMO bei einer Temperatur von 50 K weisen auf die Existenz von ein oder mehreren Typ-2-Cu(II)-Zentren hin. Bei einer Temperatur von 10 K wird sowohl ein für Häm-gebundenes Eisen als auch ein für nicht Häm-gebundenes Eisen charakteristisches Signal ersichtlich. Durch Vergleich der Cu $^{2+}$ -Konzentration mit dem Gesamtgehalt an Cu konnte ermittelt werden, dass die lösliche AMO etwa sechs paramagnetische Cu $^{2+}$ -Atome und drei diamagnetische Cu $^{1+}$ -Atome koordiniert.

Der substratanaloge kompetitive Hemmstoff Acetylen wird von der löslichen AMO zu einem Keten oxidiert. Dieses reaktive Intermediat bindet in der Folge kovalent an His 191 der AmoA-Untereinheit. Die Bindung von Keten setzt dabei ein Cu $^{1+}$ -Atom pro AmoA-Untereinheit frei und führt somit zu einer irreversiblen Hemmung der AMO. His 191 aus AmoA ist dementsprechend an der Koordination eines Cu $^{1+}$ -Zentrums beteiligt, welches die Oxidation von Ammoniak katalysiert.

Die lösliche AMO katalysiert die Disproportionierung von Hydroxylamin zu Ammoniak, Nitrit und Nitrat nach folgender Reaktionsgleichung:



Die Reaktion besitzt das Temperaturoptimum zwischen 45 und 50 °C, das pH-Optimum bei einem pH-Wert von 8,5 und wird weder von Licht noch von Sauerstoff beeinflusst. Die maximale spezifische Aktivität der Disproportionierung liegt bei etwa 1.000 nmol NH<sub>2</sub>OH (mg AMO)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> und der K<sub>m</sub>-Wert für Hydroxylamin beläuft sich auf ungefähr 140 µM. Acetylen besitzt keinen Einfluss auf die Aktivität der Disproportionierung, jedoch wirkt Hydrazin als kompetitiver Hemmstoff für die Umsetzung von Hydroxylamin durch die lösliche AMO. Eine Disproportionierung von Hydroxylamin konnte auch bei intakten *Nitrosomonas*-Zellen beobachtet werden, welche so einer Akkumulation von Hydroxylamin im Zuge der sequenziellen Ammoniakoxidation durch AMO und Hydroxylamin-Oxidoreduktase entgegenwirken. Es ist denkbar, dass die Disproportionierung von Hydroxylamin einen Mechanismus darstellt, mittels dessen sich *N. europaea* vor toxischen Hydroxylaminkonzentrationen schützt und dabei gleichzeitig ihr Substrat Ammoniak zurückgewinnt. Somit würde die Disproportionierung von Hydroxylamin einerseits zur Regulation des Stickstoff-Stoffwechsels als auch zur Energiegewinnung von *N. europaea* beitragen.

Weiterhin gelang es im Zuge dieser Arbeit die Existenz eines funktionellen Ammoniaktransporters vom Rhesus-Typ (Rh1) in *N. europaea* zu beweisen. Der passive Rh1-Transporter ermöglicht sowohl die Aufnahme von Ammoniak als auch von Methylammonium (MA) in das Cytoplasma von *N. europaea*. Die Menge an transportiertem MA korreliert dabei mit der Expression von Rh1. Der K<sub>m</sub>-Wert für MA beträgt dabei 1,8 ± 0,2 mM bei einem pH-Wert von 7,25. Die Aufnahme von MA konnte vollständig durch Ammonium gehemmt werden [K<sub>i</sub>(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) = 0,3 ± 0,1 mM]. Ein niedriger periplasmatischer pH-Wert (pH 5 - 6) während der Ammoniakoxidation scheint eine Akkumulation von Ammonium im Periplasma zu bewirken („Säurefalle“) und Rh1 ermöglicht in der Folge einen raschen Konzentrationsausgleich von NH<sub>3</sub> mit dem Cytoplasma.

*Nitrosomonas*-Zellen besitzen einen sehr flexiblen Stoffwechsel, welcher es ihnen ermöglicht, sowohl unter oxischen als auch anoxischen Bedingungen zu wachsen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Transkriptionsintensität von zentralen Genen des Stoffwechsels von *N. europaea* unter oxischen und anoxischen Bedingungen analysiert. In aerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen korrelieren die spezifische Aktivitäten der Ammoniakoxidation, der Reduktion von Nitrit, als auch die Wachstumsrate mit den Transkriptionsintensitäten der zugehörigen Gene *amoA/hao/rh1*, *nirK/norB* und *cbbL/ftsZ*. Die Konzentration von *amoA*-, *hao*-, *rh1*-, *coxA*-, *cbbL*, *ftsZ*- und *sodB*-mRNA in anaerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen war im Bezug auf aerob Ammoniak-

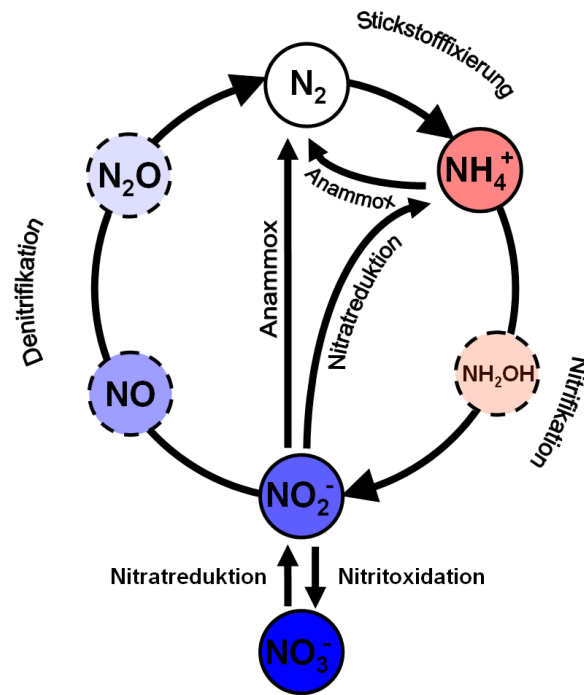
oxidierende *Nitrosomonas*-Zellen reduziert, die Konzentration an *nirK*- und *norB*-Transkript dagegen aber erhöht. Während anaerober Denitrifikation (Pyruvat dient als Substrat) stieg die Transkription der Gene *nirK*, *norB*, *aceE*, *gltA*, und *odhA* deutlich an. Die Konzentrationen von *amoA*-, *hao*-, *rhI*-, *coxA*-, *cbbL*-, *ftsZ*- und *sodB*-mRNA war im Vergleich zu aerob und anaerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen allerdings signifikant erniedrigt. Eine Veränderung der Temperatur, des pH-Werts, sowie der Konzentration an  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}$  und  $\text{NO}_2$  hatte dagegen nur einen geringfügigen Einfluss auf die Transkriptionsintensität der ausgewählten Gene.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Der biologische Stickstoffkreislauf

Der biologische Stickstoffkreislauf beschreibt die durch biologische Prozesse verursachte permanente Bewegung, Veränderung und Umlagerung des Bioelementes Stickstoff in seinen verschiedenen Formen (Abb. 1). Ammoniak-oxidierende Bakterien (AOBs) gewinnen aus der Oxidation von Ammoniak zu Nitrit ihre für bioenergetische Prozesse benötigte Energie und stellen somit einen unverzichtbaren Bestandteil des biologischen Stickstoffkreislaufes dar (Watson et al., 1989; Kowalchuk & Stephen, 2001; Vitousek et al., 2002).

Stickstoff ist eines der zentralen chemischen Elemente in unserem Ökosystem, da er als Baustein von Proteinen, DNA, Vitaminen, ATP und NAD(P)H für alle Lebewesen essentiell ist. Er zirkuliert in einem biogeochemischen Kreislauf, wobei er durch biotische als auch abiotische Faktoren in seine verschiedenen Formen beziehungsweise Oxidationsstufen überführt wird. Mit über 99 % liegt der größte Teil des Stickstoffs als reaktionsträges  $\text{N}_2$ -Gas in der Atmosphäre vor und steht somit den meisten Lebewesen nicht direkt zur Verfügung. Atmosphärischer Stickstoff gelangt jedoch durch vorwiegend mikrobielle Stickstofffixierung (Stewart, 1969; Broda, 1975; Kim & Rees, 1994) in terrestrische und aquatische Ökosysteme, wo er Pflanzen und Mikroorganismen in Form von Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) und Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) für Biosynthesen zur Verfügung steht. Die von den Produzenten synthetisierten hochmolekularen Stickstoffverbindungen werden von Destruenten im Zuge der Ammonifikation wieder in Ammonium überführt (Reber, 1974; Ferguson, 1998). Ammonium wird in der Folge von AOBs zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und dieses von Nitritoxidanten weiter zu Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) oxidiert (Abb. 1; Prosser, 1989; Teske et al., 1994). Einige Gattungen der AOBs (zum Beispiel *Nitrosomonas* und *Nitrosolobus*) sind in der Lage, unter anoxischen Bedingungen in Gegenwart von Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2$ ) oder dessen dimerer Form Distickstofftetroxid ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ), Ammoniak zu oxidieren (Schmidt, 1997; Schmidt & Bock 1997, 1998; Schmidt et al., 2001a; Schmidt & Jetten, 2004). Ferner sind auch einige Gattungen aus dem Phylum der Planctomyceten befähigt, unter anoxischen Bedingungen Ammoniak zu oxidieren (Abb. 1; Jetten et al., 1998, 2001, 2003, 2005). Bei diesem als Anammox (Anammox = anaerobe Ammoniakoxidation) bezeichneten Prozess wird in einem gekoppelten Vorgang Ammoniak oxidiert und Nitrit reduziert. Als Produkte entstehen dabei molekularer Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) und geringe Mengen an Nitrat (Strous et al., 1999; Jetten et al., 2005; op den Camp et al., 2006; Strous et al., 2006).



**Abbildung 1:** Biologischer Stickstoffkreislauf nach Schmidt et al. (2002b). Negative Oxidationsstufen des Stickstoffs sind mit roten Farbtönen, positive Oxidationsstufen mit blauen Farbtönen dargestellt. Gestrichelte Kreise weisen auf Nebenprodukte beziehungsweise Intermediate des jeweiligen Prozesses hin. Anammox, Stickstofffixierung, Nitratreduktion und Denitrifikation stellen anaerobe, Nitrifikation und Nitritoxidation aerobe Prozesse dar.

An dem Prozess der Nitrifikation sind sowohl chemolithoautotrophe als auch heterotrophe Nitrifikanten beteiligt (Prosser, 1989; Robertson & Künen, 1990; Richardson & Watmough, 1999). Allerdings sind nur Erstere in der Lage, aus der Oxidation von Ammonium Energie zu beziehen. Chemolithoautotrophe Nitrifikanten nutzen anorganische Stickstoffverbindungen als Energiequelle und Kohlendioxid ( $CO_2$ ) als Kohlenstoffquelle (Rees & Nason 1966; Hooper 1969; Prosser, 1989; Schmidt & Bock 1997; Kowalchuk & Stephen, 2001). An dem Prozess der Nitrifikation sind zwei phylogenetisch nicht verwandte Gruppen, die Ammoniak- und die Nitritoxidanten beteiligt, wobei Ammoniakoxidanten Ammoniak zu Nitrit und Nitritoxidanten Nitrit zu Nitrat oxidieren (Prosser, 1989; Teske et al., 1994). Beide Gruppen wurden ursprünglich in der Familie *Nitrobacteraceae* zusammengefasst (Watson et al., 1989). Das durch Nitrifikation produzierte Nitrat kann in der Folge entweder von Pflanzen oder Mikroorganismen assimiliert, oder durch anaerobe Atmung von denitrifizierenden Bakterien zu molekularem Stickstoff ( $N_2$ ), Stickstoffmonoxid ( $NO$ ) oder Distickstoffdioxid ( $N_2O$ ) reduziert werden (Abb. 1). Nitrifikation und Denitrifikation spielen eine wichtige

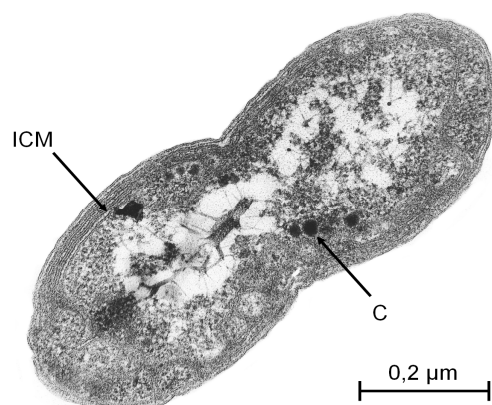
antagonistische Rolle im Stickstoffkreislauf, da durch beide Vorgänge sowohl natürlicher als auch anthropogener Eutrophierung entgegengewirkt wird.

Seit der Erfindung des Haber-Bosch-Verfahrens zur technischen Darstellung von Ammoniak aus Sauerstoff ( $O_2$ ) und Stickstoff ( $N_2$ ) und dem damit kostengünstigen Einsatz von Stickstoffdüngern in der Landwirtschaft sind anthropogene Ammoniumeinträge zu einem bedeutenden Faktor im Stickstoffkreislauf geworden (Anderson et al., 2003; Camargo & Alonso, 2006; Erisman et al., 2007). Verbrennungsvorgänge in Industrie und Kraftfahrzeugen tragen zudem durch erhebliche Emissionen von Stickoxiden ( $NO_x$ ) maßgeblich zu einer Beeinflussung des biologischen Stickstoffkreislaufs bei. Die verstärkte Ausbringung von ammonium- und nitrathaltigen Düngern bewirkt in terrestrischen und aquatischen Ökosystemen nachweislich eine erhöhte Nitrifikationsaktivität der chemolithoautotroph nitrifizierenden Organismen (Müller et al., 1998; Schuster & Conrad, 1992). Damit verbunden ist eine erhöhte Grund- und Oberflächenwasserbelastung mit Nitrit und Nitrat durch Auswaschung beider Substanzen aus dem Boden (McDonald, 1986). Dieser Umstand führt anfänglich zu einer Eutrophierung und folglich zu einer Anaerobisierung der betroffenen Gewässer. Um einer möglichen Eutrophierung entgegenzuwirken, werden daher in der modernen Abwasseraufbereitung sowohl nitrifizierende als auch denitrifizierende Bakterien eingesetzt, um lösliche Stickstoffverbindungen aus dem Abwasser zu eliminieren (Freisetzung von Stickstoff als  $NO$ ,  $NO_2$  und  $N_2$ ; Painter, 1986; Uemoto & Saiki, 2000; Tchobanoglous et al., 2001).

Aufgrund der stetig steigenden anthropogenen Beeinflussung des natürlichen Stickstoffkreislaufes geraten Ammoniakoxidanten als „Katalysatoren“ des ersten Reaktionsschrittes der Nitrifikation immer mehr in den Focus des wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Interesses (Stüven & Bock, 2001; Mota et al., 2005; Zhu et al., 2008). Es werden dementsprechend umfangreiche Bemühungen unternommen, die Ökophysiologie und Biochemie der Ammoniakoxidanten besser zu verstehen, mit dem Ziel, sie noch gezielter und effektiver in verschiedenen biotechnischen Systemen einsetzen zu können. In das Zentrum der Forschung rückt hierbei in zunehmendem Maße die initiale Oxidation von Ammoniak durch AOBs. Da die Ammoniakoxidation den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der in der Abwasseraufbereitung relevanten Nitrifikation darstellt (Rees & Nason, 1966; Bock et al., 1991; Hooper et al., 1997; Schmidt & Bock, 1997; Arp et al., 2002), könnte die katalytische Aufklärung der Ammoniakoxidation einen effizienteren technischen Einsatz von AOBs und der an der Ammoniakoxidation beteiligten Enzyme ermöglichen.

### 3.2 Systematik Ammoniak-oxidierender Bakterien

Ammoniak-oxidierende Bakterien (AOBs) wurden erstmals gegen Ende des 19. Jahrhunderts durch Frankland & Frankland (1890) sowie Winogradsky (1890) beschrieben. Zu ihren Vertretern gehören die Gattungen *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* und *Nitrosococcus*, welche sich aufgrund ihrer Zellmorphologie, insbesondere der Anordnung ihrer intracytoplasmatischen Membransysteme (ICMs), unterscheiden (Watson & Mandel, 1971; Watson et al., 1981, 1989; Koops & Möller, 1992). Jene Gattungen werden aufgrund genetischer und physiologischer Untersuchungen in 16 Arten untergliedert (Watson, 1965, 1971; Watson et al., 1971; Harms et al., 1976; Koops et al., 1976, 1990, 1991; Jones et al., 1988; Pommerening-Röser et al., 1996; Kowalchuk & Stevens, 2001). Basierend auf den 16S-rRNA Sequenzen werden alle Arten der Ammoniakoxidanten, mit Ausnahme der beiden marinen Arten *Nitrosococcus oceani* und *Nitrosococcus halophilus*, der  $\beta$ -Unterklasse der Proteobakterien zugeordnet (Woese et al., 1984, 1985; Head et al., 1993). Die beiden marinen Arten, welche eine zusätzliche äußere Zellwand aus kristallinen Schichten besitzen, gehören dagegen der  $\gamma$ -Unterklasse der Proteobakterien an (Watson & Remson, 1969, 1970). Durch den Einsatz von molekularen Markern, wie zum Beispiel PCR-Primern gegen die in AOBs ubiquitär vorhandenen Gene *amoA* und *amoB* (Klotz & Norton, 1998; McTavish et al., 1993a; Purkhold et al., 2000, 2003; Rotthauwe et al., 1995, 1997), konnten bis heute noch zahlreiche weitere Spezies beschrieben und infolgedessen komplexe phylogenetische Stammbäume aufgebaut werden.



**Abbildung 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer in Teilung befindlichen *Nitrosomonas eutropha*-Zelle. C: Carboxysom; ICM: intracytoplasmatisches Membransystem. (Bildmaterial: Dr. Ingo Schmidt)

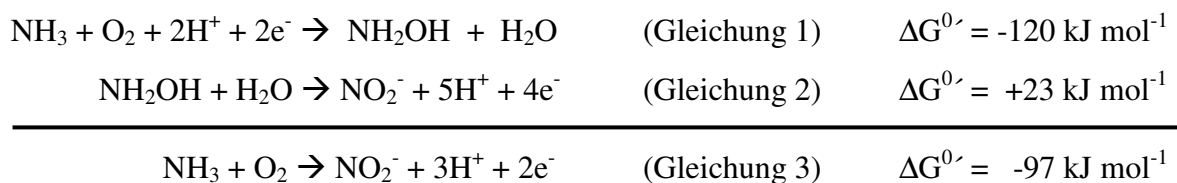
Alle Arten der Gattung *Nitrosomonas* gehören der Klasse der  $\beta$ -Proteobakterien an und besitzen einen Gram-negativen Zellwandaufbau (Head et al., 1993; Purkhold et al., 2000). Im Zellinneren konnten intracytoplasmatische Membransysteme (ICMs) nachgewiesen werden, welche sowohl peripher als auch zentral im Cytoplasma lokalisiert sind (Abb. 2; Schmidt et al., 2001b). Einige Arten der Gattung *Nitrosomonas* (zum Beispiel *Nitrosomonas eutropha*) besitzen zudem mit parakristalliner Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) gefüllte Carboxysomen (Abb. 2) und einige Arten weisen eine polare Begeißlung auf (Koops & Möller, 1992). Zu den Habitaten von *Nitrosomonas* zählen unter anderem Süßwasser, Abwasser, Boden, Fels und Mauerwerk (Wilson et al., 1997; Mansch & Bock, 1998; Bothe et al., 2000). An diesen Habitaten ist *Nitrosomonas* in der Lage, extreme Temperaturschwankungen zwischen -10 und +45 °C zu tolerieren (Bothe et al., 2000). Als optimale Wachstumsparameter wurde von Wullenweber et al. (1978) eine Temperatur von 20 bis 30 °C und ein pH-Wert zwischen 7 und 8 angegeben. Einige Arten von *Nitrosomonas* konnten auch in sauren Waldböden (Burton & Prosser, 2001; de Boer & Kowalchuk, 2001; Tarre & Green, 2004) und in stark alkalischen Soda-Seen (Bothe et al., 2000; Sorokin et al., 2001) als Mitglieder nitrifizierender mikrobieller Gemeinschaften nachgewiesen werden. *Nitrosomonas* ist ferner in der Lage, starke Nährstoffschwankungen zu tolerieren und so Hungerperioden von mehreren Monaten zu überleben (Jones & Morita, 1985; Wilhelm et al., 1998).

Ein Vertreter der Gattung *Nitrosomonas* ist das fakultativ chemolithoautotroph wachsende Bakterium *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718). Es wurde erstmals 1892 von Winogradsky isoliert und genauer beschrieben. Aufgrund seiner im Vergleich zu anderen Ammoniakoxidanten relativ kurzen Generationszeit (kürzeste veröffentlichte Generationszeit: 7 h; Wullenweber et al., 1978) ist *N. europaea* einer der bevorzugten Modellorganismen in der Forschung an Ammoniak-oxidierenden Bakterien. Im Jahre 2003 wurde das Genom mit einer Größe von 2,812 Mbp vollständig sequenziert und weitgehend annotiert (Chain et al., 2003). Durch Annotierung des Genoms konnte die Existenz aller für das chemolithoautotrophe Wachstum von *N. europaea* benötigten Genen bestätigt werden. Weiterhin wurden zahlreiche Gene identifiziert, welche für aktive als auch passive Transportproteine kodieren. Die Proteine dienen dabei fast ausschließlich dem Transport anorganischer Ionen und nur sehr wenige dem Transport organischer Substanzen.



### 3.3 Energiestoffwechsel von *Nitrosomonas europaea*

*N. europaea* gewinnt sämtliche zum Wachstum und Erhaltungsstoffwechsel benötigte Energie aus der Oxidation von Ammoniak zu Nitrit. (Rees & Nason, 1966; Bock et al., 1991; Hooper et al., 1997; Schmidt & Bock, 1997; Arp et al., 2002). Die Oxidation von Ammoniak zu Nitrit erfolgt dabei in zwei Teilschritten, welche sequentiell von den Enzymen Ammoniak-Monooxygenase (AMO) und Hydroxylamin-Oxidoreduktase (HAO) katalysiert werden. Als Schlüsselenzym katalysiert die AMO in dieser Kaskade den ersten und zugleich geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Oxidation von Ammoniak zu Hydroxylamin ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ; Gleichung 1; Rees & Nason, 1966; Dua et al., 1979; Hooper et al., 1997; Schmidt & Bock, 1997; Arp et al., 2002). Die Oxidation von Ammoniak zu Hydroxylamin läuft dabei in zwei Teilreaktionen ab. Die endergone Reaktion der Ammoniakoxidation wird durch eine an sie gekoppelte exergonische Reduktion von molekularem Sauerstoff ermöglicht, wobei zwei Reduktionsäquivalente ( $2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ ) verbraucht werden (Dua et al., 1979; Wood, 1988a). Das von der AMO gebildete Hydroxylamin wird nachfolgend von der periplasmatischen HAO mittels  $\text{H}_2\text{O}$  zu Nitrit oxidiert (Gleichung 2; Hooper & Terry, 1979; Anderson & Hooper, 1983; DiSpirito et al., 1985). Bei dieser Reaktion werden vier Reduktionsäquivalente freigesetzt, von denen zwei für die initiale Ammoniakoxidation durch die AMO benötigt werden und zwei für die Energiegewinnung beziehungsweise für biochemische Reaktionen zur Verfügung stehen (Whittaker et al., 2000; Poughon et al., 2001; Arp et al., 2002).

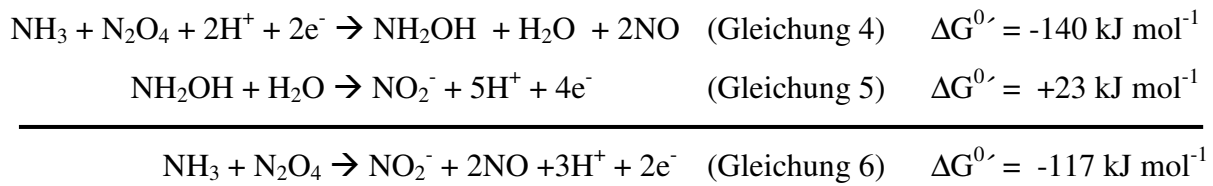


Der Beweis, dass es sich bei der durch die AMO katalysierten Reaktion um eine  $\text{O}_2$ -abhängige Monooxygenierung handelt, wurde von Dua et al. (1979) und Hollocher et al. (1981) erbracht, indem sie unter Verwendung von  $[\text{}^{18}\text{O}_2]$  als Produkte sowohl  $\text{H}_2[\text{}^{18}\text{O}]$  als auch  $\text{N}[\text{}^{18}\text{O}]_2^-$  nachweisen konnten. Evidenz, dass Ammoniak und nicht Ammonium Substrat der AMO ist, wurde durch pH-Wert-abhängige Messung des apparenten  $K_m$ -Wertes der AMO für  $\text{NH}_4^+$  erbracht (Suzuki et al., 1974; Drozd, 1976). Durch eine Erniedrigung des pH und

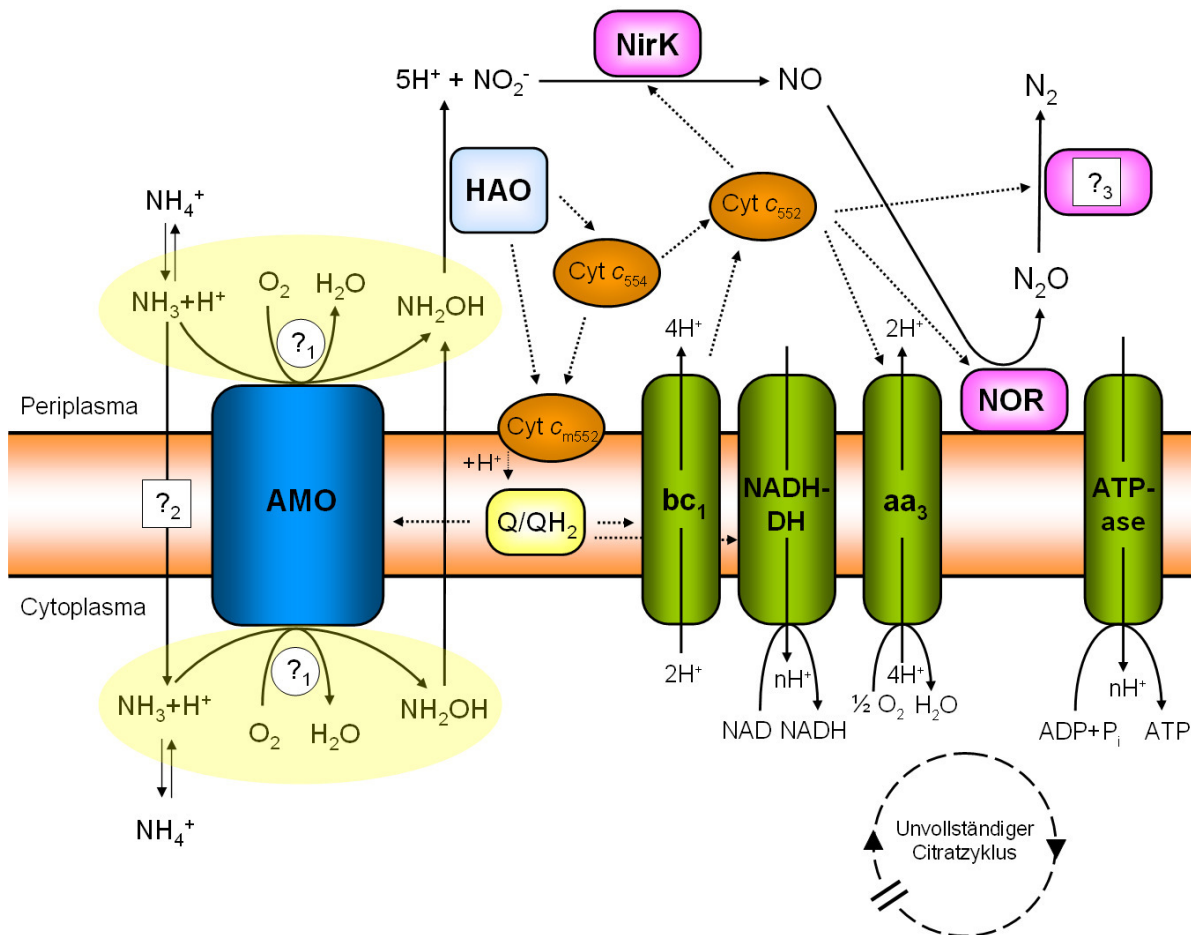
einer damit verbundenen Verschiebung des Protonierungsgleichgewichtes hin zum Ammonium, erhöhte sich der scheinbare  $K_m$ -Wert für Ammonium signifikant. Der  $K_m$ -Wert, berechnet für  $\text{NH}_3$ , blieb hingegen innerhalb des physiologischen Bereiches der AOBs (pH 6,8 - 8,2) mit 20  $\mu\text{M}$  nahezu konstant (Suzuki et al., 1974; Schmidt & Bock, 1998).

Die genaue Lokalisation der AMO in der Bakterienzelle und damit der Ammoniakoxidation ist derzeit noch umstritten (Abb. 3; Hooper & DiSpirito, 1985; Hooper et al., 1997; Whittaker et al., 2000). Hinweise über die Lokalisation der Ammoniakoxidation bieten Untersuchungen von Suzuki et al. (1974) sowie Schmidt & Bock (1998), welche die AMO-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert ermittelten. Beide Gruppen konnten unterhalb eines pH-Werts von 6,5 keine Ammoniakoxidationsaktivität mehr feststellen. Da der periplasmatische Raum von *N. europaea* einen pH-Wert zwischen 5 und 6 (Weidinger et al., 2007) und das Cytoplasma einen pH-Wert zwischen 7 und 8 aufweist (Kumar & Nicholas, 1983), deutet dies auf eine cytoplasmatische Lokalisation der AMO hin. Für eine Lokalisation der AMO im Cytoplasma spricht zudem, dass die Oxidation von Ammoniak im Cytoplasma zwei Reduktionsäquivalente ( $2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ ) verbraucht. Eine damit verbundene Reduktion der intrazellulären Protonenkonzentration würde in Kombination mit der periplasmatischen Produktion von Protonen (HAO setzt bei der Oxidation von Hydroxylamin  $4\text{H}^+$  frei; Hooper & Terry, 1979; Anderson & Hooper, 1983; DiSpirito et al., 1985) signifikant zum Aufbau eines Protonengradienten (PMF) und einer Energetisierung der Cytoplasmamembran beitragen. Eine periplasmatische Lokalisation der AMO würde dagegen den energieliefernden Protonengradienten deutlich reduzieren.

Neben der sauerstoffabhängigen Ammoniakoxidation sind einige Arten der AOBs (zum Beispiel *N. europaea*, *N. eutropha* und *Nitrosospira multiformis*) in der Lage, unter anoxischen Bedingungen Ammoniak zu Nitrit zu oxidieren (Gleichung 6; Schmidt & Bock, 1997, 1998; Schmidt et al., 2001b, 2002a). Als Oxidationsmittel dient hierbei Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2$ ) beziehungsweise dessen dimere Form Distickstofftetroxid ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ). Unter anoxischen Bedingungen wird bei der von der AMO katalysierten Reaktion zusätzlich Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$ ) freigesetzt (Gleichung 4; Schmidt & Bock, 1997). Die Oxidation von Hydroxylamin durch HAO läuft dagegen unter oxischen und anoxischen Bedingungen gleich ab (Gleichungen 2 und 5; Hooper & Terry, 1979; Anderson & Hooper, 1983; DiSpirito et al., 1985).



Die bei der Oxidation von Hydroxylamin (Gleichungen 2 und 5) freigesetzten Elektronen werden auf das membranständige Cytochrom  $c_{m552}$  oder das lösliche Cytochrom  $c_{554}$  übertragen (Abb. 3; Yamanaka & Shinra, 1974; Klotz et al., 2008). Von Cytochrom  $c_{m552}$  aus werden die Elektronen auf den Ubichinonpool (Q/QH<sub>2</sub>, Abb. 3) übertragen, von dem sie zur AMO zurückgeführt werden (Shears & Wood, 1986; Whittaker et al., 2000; Arp et al., 2002; Hooper et al., 2005). Es ist allerdings noch nicht geklärt, ob die AMO die zur Oxidation von Ammoniak benötigten Elektronen direkt von diesem Ubichinonpool erhält oder diese über zwischengeschaltete Elektronenüberträger bezieht. Die verbleibenden für bioenergetische Zwecke zur Verfügung stehenden Elektronen gelangen über den Cytochrom- $bc_1$ -Komplex oder über lösliches Cytochrom  $c_{552}$  zur terminalen Cytochrom- $c$ -Oxidase ( $aa_3$ ; Abb. 3) der Atmungskette. Von dort aus werden sie unter oxischen Bedingungen, gekoppelt mit dem Aufbau des Protonengradienten (proton motive force, PMF), auf molekularen Sauerstoff übertragen (Kumar & Nicholas, 1983; DiSpirito et al., 1986; Arp & Stein, 2003). Die PMF kann in *N. europaea* unter anderem von der membranintegralen NADH-Dehydrogenase (NADH-DH; Abb. 3) genutzt werden, um durch rückläufigen Elektronentransport NADH aus NAD zu regenerieren (Whittaker et al., 2000). Unter anoxischen Bedingungen dient Nitrit anstelle von Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor (Poth & Focht, 1985; Bock et al., 1995; Hooper et al., 1997; Schmidt et al., 2004c). Unter denitrifizierenden Bedingungen werden die durch die Oxidation von Hydroxylamin freigesetzten Elektronen über Cytochrom  $c_{554}$  und Cytochrom  $c_{552}$  auf eine Nitrit-Reduktase (NirK), eine NO-Reduktase (NOR) und eine bis jetzt noch nicht identifizierte N<sub>2</sub>O-Reduktase (?) übertragen (Abb. 3; Zumft, 1997; Ferguson, 1998; Beaumont et al., 2002; Cantera & Stein, 2007). Der genaue Mechanismus der im Zuge der Denitrifikation ablaufenden N<sub>2</sub>-Bildung konnte jedoch noch nicht geklärt werden (Abb. 3; Poth & Focht, 1985; Abeliovich & Vonshak, 1992; Shrestha et al., 2001, 2002; Schmidt et al., 2004c).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung eines Teils des Energiestoffwechsels in *Nitrosomonas* (verändert nach Hooper & DiSpirito, 1985; Hooper et al., 1997; Whittaker et al., 2000; Schmidt et al., 2002a; Arp & Stein, 2003; Schmidt et al., 2004c; Hooper et al., 2005; Arp et al., 2007; Cantera & Stein, 2007; sowie Klotz & Stein, 2008). Ein Transfer von Elektronen und Reduktionsäquivalenten ( $H^+ + e^-$ ) ist durch gestrichelte Pfeile dargestellt. Der Citratzyklus ist trotz kompletter genetischer Ausstattung (Chain et al., 2003) unter oxischen Bedingungen nicht vollständig, da keine 2-Oxoglutarat-Dehydrogenaseaktivität nachgewiesen werden konnte (Hooper, 1969). AMO: Ammoniak-Monooxygenase; HAO: Hydroxylamin-Oxidoreduktase; NirK: Nitrit-Reduktase; NOR: NO-Reduktase; Cyt  $c_{552}$ : membranständiges Cytochrom  $c_{552}$ ; Cyt  $c_{552}$  und Cyt  $c_{554}$ : lösliche Cytochrome  $c_{552}$  und  $c_{554}$ ; Q/QH<sub>2</sub>: Ubichinon-Ubichinol-Pool; NADH-DH: NADH-Dehydrogenase (Komplex I);  $bc_1$ : Cytochrom- $bc_1$ -Komplex (Komplex III);  $aa_3$ : terminale Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV); ?<sub>1</sub>: Es fehlen Erkenntnisse über die Lokalisation der Ammoniakoxidation. Aus diesem Grund ist die Ammoniakoxidation im Cytoplasma als auch im Periplasma modelliert. ?<sub>2</sub>: potentieller Ammoniaktransporter (siehe Kapitel 4.2); ?<sub>3</sub>: unbekannter Mechanismus der N<sub>2</sub>O-Reduktion.

Unter sauerstofflimitierten und anoxischen Bedingungen besitzt *N. europaea* die Möglichkeit simultan zu nitrifizieren und zu denitrifizieren (Abeliovich & Vonshak, 1992; Bock et al., 1995). Eine anaerobe Ammoniakoxidation ist mit Stickstoffdioxid beziehungsweise dessen dimerer Form (NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) als Oxidationsmittel anstelle von Sauerstoff möglich (Schmidt, 1997; Schmidt & Bock, 1997, 1998). Weiterhin besitzt *N. europaea* die Möglichkeit Acetat,

Pyruvat oder molekularen Wasserstoff als Elektronendonator und Nitrit als Elektronenakzeptor zu nutzen, wobei Stickstoffmonoxid (NO), Distickstoffoxid (N<sub>2</sub>O) und Stickstoff (N<sub>2</sub>) entstehen (Abeliovich & Vonshak, 1992; Bock et al., 1991, 1995; Stüven et al., 1992).

Als autotropher Mikroorganismus ist *N. europaea* in der Lage, als alleinige Kohlenstoffquelle CO<sub>2</sub> zu nutzen und dieses durch den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (CBB-Zyklus) durch eine Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) vom Typ I in organischem Zellmaterial zu fixieren (Nicholas & Rao, 1964; Utaker et al., 2002; Wei et al., 2004). Schmidt et al. (2004b) konnten ferner zeigen, dass *N. europaea* in Abwesenheit von Kohlenstoffdioxid auch zu chemolithoheterotrophem Wachstum mit Laktat oder Pyruvat als Kohlenstoffquelle befähigt ist. Hommes et al. (2003) identifizierten zudem Fruktose als mögliche Kohlenstoffquelle für *N. europaea*.

### 3.4 Die Ammoniak-Monooxygenase

Die Ammoniak-Monooxygenase (AMO) katalysiert die für den Energiestoffwechsel von *N. europaea* bedeutsame initiale Oxidation von Ammoniak zu Hydroxylamin. Die AMO ist auch in der Lage, zahlreiche organische Substanzen, jedoch ohne Energiegewinn, zu oxidieren (Bédard & Knowles, 1989). Hierzu zählen unter anderem Methan (Hyman & Wood, 1983; Jones & Morita, 1983b), Kohlenstoffmonoxid (CO; Erickson & Hooper, 1972; Tsang & Suzuki, 1982; Jones & Morita, 1983a), Cyclohexan (Drozd, 1980), Benzol (Hooper, 1969), Dimethylether (Voysey & Wood, 1987; Miller et al., 1993; Hyman et al., 1994), Alkane und Alkene (Hyman et al., 1988) als auch Ethen, wobei bei letzterem auch eine für Monooxygenasen untypische Epoxidierung beobachtet werden konnte (Hyman & Wood, 1984). Weiterhin katalysiert die AMO die in der technischen Bioremediation bedeutsame Oxidation von halogenierten oder aromatischen Kohlenwasserstoffen (Hyman & Wood, 1983; Jones & Morita, 1983b; Voysey & Wood, 1987; Rasche et al., 1991; Keener & Arp, 1994; Arp & Stein, 2003) sowie Sulfiden und Sulfoxiden (Juliette et al., 1993).

Das breite Substratspektrum der AMO ist auch für die Inhibition der Ammoniakoxidation durch eine Vielzahl chemischer Substanzen verantwortlich. Nichtkompetitive, reversible Hemmstoffe der AMO sind unter anderem Ethan und Chlorethan (Rasche et al., 1991) als auch metallchelatierende Substanzen wie Allylthioharnstoff oder Diethyldithiocarbamat (Lees, 1952). Als irreversible Hemmstoffe der AMO sind Trichlorethylen (Rasche et al., 1991) und Acetylen (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>; Hynes & Knowles, 1978; Hyman & Wood, 1985) bekannt. Acetylen, nach der IUPAC-Nomenklatur auch Ethin genannt, stellt

für die AMO einen irreversiblen Hemmstoff dar, welcher im Laufe der Katalyse kovalent an das Enzym bindet und dadurch weitere katalytische Zyklen der AMO verhindert (Hynes & Knowles, 1978; Hyman & Wood, 1985). Da Acetylen aufgrund seiner sauren C-H- Bindung als Substratanalogon mit Ammoniak konkurriert, schützt eine hohe Ammoniak-Konzentration das Enzym vor der inhibierenden Wirkung von Acetylen (Hyman & Arp, 1992; Schmidt et al., 2001a). Durch den Einsatz von radioaktiv markiertem Acetylen ( $[^{14}\text{C}]$ -Acetylen) gelang es erstmals die AMO aus *N. europaea* zu identifizieren (Hyman & Wood, 1985; Hyman & Arp, 1992, 1995; Schmidt & Bock, 1998; Schmidt et al., 2001a). Neben Acetylen besitzen auch sämtliche anderen bekannten Hemmstoffe der AMO eine hydrophobe Natur. Diese Beobachtung lässt sowohl auf einen hydrophoben Charakter des aktiven Zentrums als auch der allosterischen Bindungsstelle schließen. Zudem bekräftigt dies die Vermutung, dass Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) und nicht das polare Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) das eigentliche Substrat der AMO darstellt. Neben chemischen Substanzen ist zudem auch Licht von verschiedenen Wellenlängen (300-340 nm sowie 400-430 nm) in der Lage, die Ammoniakoxidation zu inhibieren (Hooper & Terry, 1973, 1974; Shears & Wood, 1985). Ob Licht allerdings einen direkten Einfluss auf die AMO besitzt, ist bislang noch unbekannt.

Eine Charakterisierung der AMO ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nur sehr eingeschränkt gelungen, da sich die Handhabung der AMO in zellfreien Systemen aufgrund eines raschen Aktivitätsverlustes als äußerst schwierig erwies. Da auch kein gereinigtes Protein zur Verfügung stand, sind sowohl Struktur, katalytischer Mechanismus als auch eventuelle Kofaktoren der AMO kaum erforscht. Ein Großteil des Wissens um die molekularen Eigenschaften des Enzyms leitet sich aus Experimenten mit intakten *Nitrosomonas*-Zellen (Ensign et al., 1993), bioinformatischen Analysen des seit 2003 sequenzierten Genoms von *N. europaea* (Chain et al., 2003) oder aus Vergleichsstudien mit der auf genetischer und funktioneller Ebene homologen partikulären Methan-Monooxygenase (pMMO) der methylophilen Bakterien ab (Zahn & DiSpirito, 1996; Hooper et al., 1997; Arp et al., 2002; Arp & Stein, 2003; Schmidt & Jetten, 2004; Lieberman & Rosenzweig, 2005; Balasubramanian & Rosenzweig, 2007; Hakemian et al., 2008; Rosenzweig, 2008). *In vitro*-Studien zur Ammoniakoxidationsaktivität von Sphäroplasten und zellfreien Extrakten wurden erstmals von Suzuki & Kwok (1969, 1970) und Suzuki et al. (1981) durchgeführt. Der ammoniumabhängige Sauerstoffverbrauch betrug allerdings unmittelbar nach Zellaufschluss mit ungefähr  $82 \text{ nmol O}_2 (\text{mg Protein})^{-1} \text{ min}^{-1}$ , nur noch maximal 10 % des ammoniumabhängigen Sauerstoffverbrauchs von Zellsuspensionen (Suzuki & Kwok, 1970; Ensign et al., 1993; Juliette et al., 1995; Schmidt & Bock, 1998). Neben den geringen Aktivitäten stellte

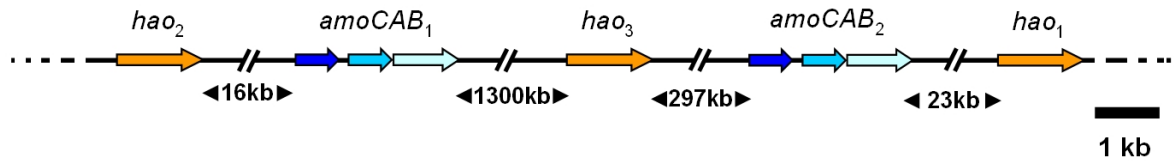
zudem ein schneller Aktivitätsverlust in zellfreien Extrakten ein weiteres Problem für eine exaktere Charakterisierung der Ammoniakoxidation durch die AMO dar. Innerhalb von vier Stunden sank die bereits schon anfänglich geringe Aktivität zellfreier Extrakte bei 4 °C bereits um die Hälfte. Spätestens nach weiteren vier Stunden war keine Aktivität mehr festzustellen (Suzuki et al., 1981). Juliette et al. (1995) gelang es durch Zusatz von hohen Konzentrationen an BSA und Lecithin (beide jeweils 10 mg ml<sup>-1</sup>) sowie Phenylmethylsulfonylfluorid (0,5 mM PMSF) die Ammoniakoxidationsaktivität für bis zu 72 Stunden aufrechtzuerhalten. Allerdings war auch hier ein zeitabhängiger Verlust der Ammoniakoxidationsaktivität festzustellen und spätestens nach 96 Stunden war keine Aktivität mehr messbar. Der Grund des rapiden Aktivitätsverlustes der AMO *in vitro* ist bis heute noch unklar. Es wird vermutet, dass der AMO in zellfreien Extrakten kein physiologisch intaktes Netzwerk aus Elektronendonoren zur Verfügung steht, wie es in intakten Bakterien der Fall ist. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass durch Zellaufschluss und Präparation der subzellulären Fraktionen von *N. europaea* katalytische Metalle aus den aktiven Zentren der AMO herausgelöst werden, was folglich zu einem irreversiblen Verlust der Ammoniakoxidationsaktivität führt (Loveless & Painter, 1968; Hooper & Terry, 1973; Ensign et al., 1993).

Bereits früh wurde vermutet, dass Kupfer ein katalytischer Bestandteil der aktiven AMO sein könnte (Lees, 1946). Hooper & Terry (1973) bekräftigten diese Vermutung, indem sie durch Zugabe der kupferchelatierenden Substanz Allylthioharnstoff die Ammoniakoxidationsaktivität in *N. europaea* zum Erliegen bringen konnten. Die Zugabe von Kupfer zu zellfreien Extrakten von *N. europaea* bewirkte dagegen eine Steigerung der Ammoniakoxidationsaktivität (Loveless & Painter, 1968; Bédard & Knowles, 1989). Im Jahre 1993 gelang Ensign et al. sogar eine Reaktivierung der AMO, indem er Zellextrakte von *N. europaea* mit CuCl<sub>2</sub> bis zu einer Konzentration von 500 µM versetzte. Die Rate der Ammoniakoxidation stieg nach Kupferzugabe auf das fünf- bis fünfzehnfache der anfänglichen Aktivität an. Die Zugabe von weiteren redoxaktiven Metallen führte dagegen zu keiner Erhöhung der Ammoniakoxidationsaktivität (Ensign et al., 1993). Die Zugabe von bestimmten Metallen, wie zum Beispiel Zink (in Form von ZnCl<sub>2</sub>), zu zellfreien Extrakten und Zellsuspensionen bewirkte sogar ein drastisches Absinken der Ammoniakoxidationsaktivität (Fruehling et al., 2001; Radniecki & Ely, 2008; Radniecki et al., 2009). Die Beobachtungen, dass sowohl die Ammoniakoxidationsaktivität in *N. europaea* (Shears & Wood, 1985) als auch die Aktivität der kupferhaltigen Enzyme Tyrosinase und Hämocyanin (Lerch, 1981) durch UV-Licht inhibiert werden, ließen ebenfalls auf eine Beteiligung von

Kupfer am Aufbau der AMO schließen. Als weiteres am Aufbau der AMO beteiligtes Metall wurde zudem Eisen vermutet. Elektronenspinresonanz-Analysen von *Nitrosomonas*-Membranfraktionen deuteten auf eine Beteiligung von Eisen am katalytischen Ablauf der Ammoniakoxidation beziehungsweise am intramolekularen Elektronentransport der AMO hin (Zahn et al., 1996).

Die AMO aus *N. europaea* wird durch Acetylen irreversibel inhibiert (Hynes & Knowles, 1978; Hyman & Wood, 1985; Schmidt & Bock, 1998). Untersuchungen der Hemmungskinetik legen nahe, dass die Hemmung als Folge einer versuchten Oxidation der Dreifachbindung des Acetylens erfolgt (Hynes & Knowles, 1978; Hyman & Wood, 1985). Infolge der Zugabe von radioaktiv markiertem [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetylen zu einer aktiv Ammoniakoxidierenden *Nitrosomonas*-Kultur wurde die Ammoniakoxidationsaktivität vollständig gehemmt und es konnte ein Protein mit einer apparenten molekularen Masse von 27 kDa isoliert werden, das kovalent modifiziert und  $^{14}\text{C}$ -markiert war (Hyman & Wood, 1985; Hyman & Arp, 1992, 1995; Schmidt & Bock, 1998; Schmidt et al., 2001a, Gilch et al., 2009b). Das durch Acetylen modifizierte 27 kDa große Protein wird als AmoA bezeichnet. Es wird aufgrund der Acetylenbindung angenommen, dass AmoA das aktive Zentrum für die Ammoniakoxidation beherbergt (Hyman & Wood, 1985). Bei der Aufreinigung des solubilisierten AmoA-Polypeptids aus der Membranfraktion von *N. europaea* wird ein weiteres Polypeptid mit einer apparenten molekularen Masse von 40 kDa mitgereinigt, welches als AmoB-Polypeptid bezeichnet wird (McTavish et al., 1993a). Das für das AmoB-Polypeptid kodierende Gen *amoB* konnte unmittelbar stromabwärts des *amoA*-Gens lokalisiert werden. Beide Gene, *amoA* und *amoB*, bilden ein gemeinsames Leseraster, was folglich auf eine Beteiligung von AmoB am Aufbau des aktiven AMO-Enzymkomplexes schließen lässt (McTavish et al., 1993a; Bergmann & Hooper, 1994). Durch Abgleich der N-terminalen Aminosäuresequenz des AmoB-Polypeptids mit der Nukleotidsequenz des *amoB*-Gens wurde ein N-terminales Signalpeptid mit einer Länge von 37 Aminosäuren prognostiziert, welches beim isolierten AmoB-Polypeptid bereits proteolytisch abgespalten war (McTavish et al., 1993a). Klotz et al. (1997) konnten ein weiteres, stromaufwärts des *amoAB*-Clusters gelegenes, Gen identifizieren. Es wurde in der Folge als *amoC* bezeichnet, da es zusammen mit dem *amoAB*-Cluster eine Transkriptionseinheit mit einem gemeinsamen Promotor bildet (Abb. 4; Klotz et al., 1997; Sayavedra-Soto et al., 1998; Chain et al., 2003).

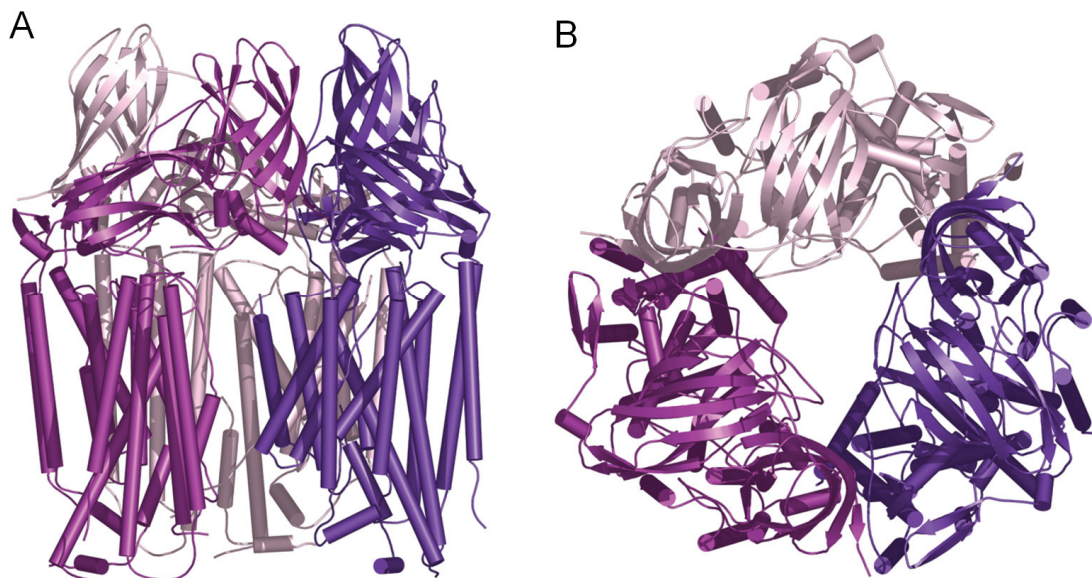




**Abbildung 4:** Anordnung der Gene für Ammoniak-Monooxygenase (*amo*) und Hydroxylamin-Oxidoreduktase (*hao*) im Genom von *N. europaea* (verändert nach Chain et al., 2003).

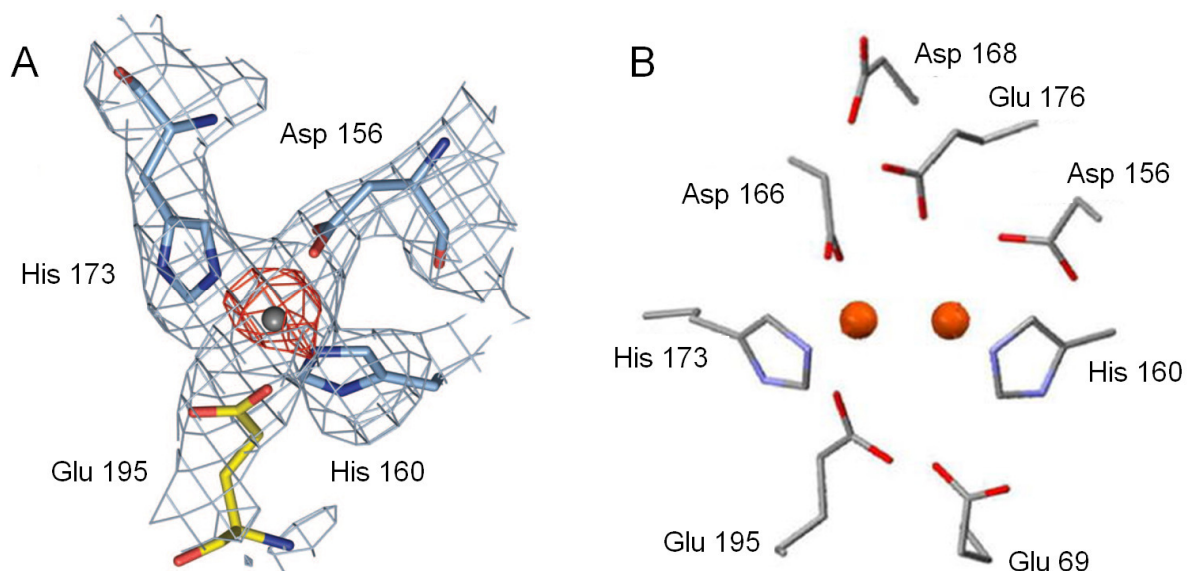
Im Genom von *N. europaea* liegt der Cluster *amoCAB* in zwei Kopien vor (Abb. 4; McTavish et al., 1993a,b; Sayavedra-Soto et al., 1998; Chain et al., 2003) und die Expression unterliegt einer positiven Regulation durch Ammoniak, NO und NO<sub>2</sub> (McTavish et al., 1993a; Klotz et al., 1997; Sayavedra-Soto et al., 1998; Hommes et al., 2001; Schmidt et al., 2001b,c). Knockout-Mutanten von *N. europaea* mit jeweils einem durch eine Kanamycinkassette inaktivierten *AmoA1*-, *AmoA2*-, *AmoB1*- oder *AmoB2*-Gen sind proliferationsfähig, wenn auch nur mit reduzierten Wachstumsraten. Dieser Umstand weist auf eine Austauschbarkeit der entsprechend kodierten Genprodukte AmoA und AmoB am AMO-Komplex hin (Hommes et al., 1998; Stein et al., 2000). Das *amoC*-Gen befindet sich neben den beiden geclusterten *amoC*-Genen in einer dritten Kopie auf dem Genom von *N. europaea* (Norton et al., 1996; Klotz & Norton, 1998; Sayavedra-Soto et al., 1998; Chain et al., 2003). Jedoch besitzt diese Kopie nur noch 68 % Sequenzhomologie zu *amoC1* und *amoC2* (Chain et al., 2003). Als Produkt der heterologen Expression des *amoC1*- und *amoC2*-Gens wurde ein Protein mit einer apparenten Masse von 30 kDa erhalten (Klotz et al., 1997). Bis jetzt konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden, dass AmoC mit dem AmoA-AmoB-Komplex assoziiert vorliegt. Klotz et al. (1997) postulierten daraufhin, dass AmoC möglicherweise als Chaperon die korrekte Einlagerung des Polypeptids in die Cytoplasmamembran oder eine korrekte Faltung des AMO-Komplexes ermöglicht. Eine genauere Untersuchung der drei identifizierten Polypeptide mittels Hydropathiediagrammen auf Basis des Kyte-Doolittle-Algorithmus prognostizierte vier bis fünf potentielle Transmembrandomänen für AmoA, zwei bis drei für AmoB und sechs potentielle Transmembrandomänen für AmoC (McTavish et al., 1993a; Klotz et al., 1997). Aufgrund dieser Prognosen, der Existenz einer Signalsequenz am N-Terminus des AmoB-Polypeptids sowie der kovalenten Markierung des AmoA-Polypeptids in der Membranfraktion von *N. europaea* mit [<sup>14</sup>C]Acetylen wurde postuliert, dass die AMO als ein membranassoziierter oder membranintegraler Proteinkomplex vorliegt (Hyman & Wood, 1985; McTavish et al., 1993a).

Die genaue Untereinheitenstruktur des aktiven AMO-Komplexes ist trotz zahlreicher Bemühungen bis heute noch unbekannt. Vergleiche mit der strukturell und funktionell sehr ähnlichen partikulären Methan-Monooxygenase (pMMO) des methylo trophen Bakteriums *Methylococcus capsulatus* (Bath) weisen jedoch auf einen heteromultimeren Aufbau der AMO hin (Nguyen et al., 1998; Lieberman & Rosenzweig, 2005). Beide Enzyme katalysieren ähnliche Reaktionen und besitzen ein ähnliches Inhibitor- und Substratspektrum (Zahn & DiSpirito, 1996; Hooper et al., 1997; Arp et al., 2002; Arp & Stein, 2003; Schmidt & Jetten, 2004). Durch Vergleich der Gensequenzen von AMO (*amoCAB*) und pMMO (*pmoCAB*) sowie der Anordnung der einzelnen Gene innerhalb der jeweiligen Cluster wurde zudem eine evolutionäre Verwandtschaft der beiden Monooxygenasen prognostiziert (Semrau et al., 1995). Für die pMMO aus *M. capsulatus* (Bath) konnte durch Ermittlung der Kristallstruktur eine heterotrimere  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ -Untereinheitenstruktur ( $\alpha$  = PmoB;  $\beta$  = PmoA;  $\gamma$  = PmoC) mit einer molekularen Masse von etwa 280 kDa nachgewiesen werden (Abb. 5; Lieberman & Rosenzweig, 2005). Der heterotrimere pMMO-Komplex besitzt aufgrund seiner 42 größtenteils parallel zueinander angeordneten transmembranspannenden (TM)  $\alpha$ -Helices (14 TM-Helices pro  $\alpha\beta\gamma$ -Protomer) eine membranintegrale Struktur. (Abb. 5; Lieberman & Rosenzweig, 2005; Balasubramanian & Rosenzweig, 2007; Hakemian et al., 2008; Rosenzweig, 2008).



**Abbildung 5:** Röntgenkristallstruktur der heterotrimeren pMMO aus *M. capsulatus* (Bath) nach Lieberman & Rosenzweig (2005). A: Ansicht parallel zur Membranebene; B: Ansicht senkrecht zur Membranebene. Die drei Protomere ( $\alpha\beta\gamma$ ) sind in violett, lila und rosa dargestellt. Zylinder repräsentieren  $\alpha$ -Helices und Pfeile  $\beta$ -Faltblätter.

pMMO aus *M. capsulatus* (Bath) enthält neun Kupfer- und drei Zinkatome, wobei die Kupferatome jeweils als mono- und dinukleares Kupferzentrum von den drei PmoB-Untereinheiten koordiniert werden. Die Zink-Atome werden dagegen jeweils von drei Aminosäuren aus der PmoC-Untereinheit (Asp 156, His 160 und His 173) sowie einer Aminosäure aus der PmoA-Untereinheit koordiniert (Glu 195; Abb. 6A; Lieberman & Rosenzweig, 2005). Es ist aber fraglich, ob die durch Röntgenkristallstrukturanalyse ermittelte Anzahl an Metallen die tatsächliche Metallausstattung der pMMO *in vivo* widerspiegelt, da sowohl gereinigte als auch kristalline pMMO aus *M. capsulatus* (Bath) katalytisch nicht aktiv ist (Lieberman & Rosenzweig, 2005). Andere Gruppen berichteten ferner von zwei bis 15 Kupferatomen pro  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ -Heterotrimer (Nguyen et al., 1998; Basu et al., 2003; Choi et al., 2003; Yu et al., 2003; Lieberman et al., 2003). Martinho et al. (2007) und Tumanova et al. (2008) erbrachten basierend auf Mössbauer-Studien den Nachweis von dinuklearen Eisenzentren. Sie postulierten, dass das mononukleare Zink-Zentrum (Lieberman & Rosenzweig, 2005) *in vivo* durch ein dinukleares Eisenzentrum ersetzt ist (Abb. 6B). Von der pMMO auf die AMO übertragen, lassen diese Erkenntnisse vermuten, dass die AMO aus *N. europaea* eine heterotrimere  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ -Untereinheitenstruktur besitzt und die Metalle Kupfer, Eisen und womöglich Zink koordiniert.



**Abbildung 6:** Koordination von mononuklearem Zink oder dinuklearem Eisen durch pMMO von *M. capsulatus* (Bath). A: Modell des mononuklearen Zink-Zentrums nach Lieberman & Rosenzweig (2005) basierend auf der Röntgenkristallstruktur; B: alternatives Modell eines dinuklearen Eisenzentrums nach Martinho et al. (2007) basierend auf Mössbauer-Spektroskopie. Glu 195 und Glu 69 stammen von der PmoA-Untereinheit, alle anderen Aminosäuren sind ein Bestandteil der PmoC-Untereinheit.

Die HAO katalysiert die Umsetzung des von der AMO produzierten Hydroxylamins zu Nitrit. Wasser dient hierbei als Oxidationsmittel (Hooper & Terry, 1979; Anderson & Hooper, 1983; DiSpirito et al., 1985). Neben Hydroxylamin ist die HAO auch in der Lage, den kompetitiven Inhibitor Hydrazin ( $N_2H_4$ ) zu molekularem Stickstoff zu oxidieren (Hooper & Nason, 1965; Anderson & Hooper, 1983; Schmidt & Bock, 1998; Hendrich et al., 2002). Das für die HAO kodierende Gen liegt im Genom von *N. europaea* in drei Kopien vor (Abb. 4; McTavish et al., 1993b; Chain et al., 2003). Die Gensequenz zweier Kopien ist identisch, die dritte unterscheidet sich dagegen in einem Nukleotid (Hommes et al., 2001; Chain et al., 2003). Knockout-Mutanten mit jeweils einem durch eine Kanamycinkassette inaktiviertem *hao*-Gen unterscheiden sich in Wachstumsraten und spezifischen HAO-Aktivitäten nicht vom Wildtyp (Hommes et al., 1996).

Die HAO aus *N. europaea* ist bereits strukturell und funktionell aufgeklärt (Igarashi et al., 1997). Sie besitzt eine homotrimere Untereinheitenstruktur und befindet sich als lösliches Enzym im periplasmatischen Raum (Hooper & Terry, 1977; Hooper et al., 1978; Olson & Hooper, 1983; DiSpirito et al., 1985; Hooper et al., 1984; Hoppert et al., 1995). Jede HAO-Untereinheit wird anfänglich mit einer Leadersequenz von 23 Aminosäuren synthetisiert, die als Erkennungssequenz für den zellulären Translokationsapparat dient (Shiemke et al., 2004). Insgesamt weist jede Untereinheit eine molekulare Masse von 64 kDa auf und koordiniert sieben Hämgruppen des *c*-Typs sowie eine vom P460-Typ (Igarashi et al., 1997). Letztere fungiert dabei als katalytisches Zentrum (Hooper et al., 1997; Igarashi et al., 1997). Die sieben Hämgruppen des *c*-Typs sind aufgrund ihrer unterschiedlich abgestuften Redoxpotentiale sowohl für den intramolekularen Elektronentransport als auch für die Übertragung der bei der Oxidation von Hydroxylamin entstehenden Elektronen auf Cytochrom *c*<sub>554</sub> verantwortlich (Hooper & Balny, 1982; Olson & Hooper, 1983; DiSpirito et al., 1985; Hooper, 1989; Igarashi et al., 1997; Igarashi & Tanaka, 2001).

### 3.5 Fragestellung, Zielsetzung und Strategie der Arbeit

Obwohl Ammoniak-oxidierende Bakterien seit über einem Jahrhundert bekannt sind und intensiv auf ihre physiologischen, biochemischen, genetischen und ökologischen Eigenschaften untersucht wurden, sind viele biochemische Vorgänge der Ammoniak-oxidanten, besonders im Energiestoffwechsel, nur unvollständig verstanden. Bereits der erste Schritt des chemolithotrophen Energiestoffwechsels, die Oxidation von Ammoniak zu

Hydroxylamin durch die AMO, ist nur zum Teil aufgeklärt. So stand bis zum heutigen Zeitpunkt keine gereinigte AMO für enzymatische und strukturelle Untersuchungen zur Verfügung. Selbst die subzelluläre Lokalisation des Enzyms wurde kontrovers diskutiert. Ist die AMO aus *N. europaea* ein membrangebundener oder gar membranintegraler Proteinkomplex, wie bioinformatische Untersuchungen als auch Homologiestudien es vermuten lassen? Welche Untereinheiten sind am Aufbau des aktiven Enzymkomplexes beteiligt und sind wirklich alle vom *amoCAB*-Operon kodierten Polypeptide Komponenten dieses Komplexes? Welche katalytischen und/oder strukturellen Metalle sind am Aufbau und an der Katalyse der AMO beteiligt? Weitgehend ignoriert wurde zudem die Frage, wie *N. europaea* in der Lage ist, ihr energielieferndes Substrat Ammoniak aufzunehmen und sich im Wettstreit um die Ressource Ammoniak gegenüber anderen heterotrophen Konkurrenten durchzusetzen. Darüber hinaus ist es noch unklar, durch welche Mechanismen *N. europaea* in der Lage ist, ihren Stoffwechsel an wechselnde oxische beziehungsweise anoxische Bedingungen anzupassen. Erfolgt die Regulation der Stoffwechselwege auf transkriptionaler oder (post-)translationaler Ebene?

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die subzelluläre Lokalisation der AMO aus *N. europaea* zu bestimmen und das Enzym sowohl strukturell als auch biochemisch zu charakterisieren. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde zu Beginn durch molekularbiologische, radiochemische und physiologische Untersuchungen die Frage nach der subzellulären Lokalisation der AMO geklärt. Darauf aufbauend wurde durch Verwendung von unterschiedlichen proteinchromatographischen Methoden sowohl katalytisch aktive AMO als auch durch Acetylen inaktivierte AMO aufgereinigt und strukturell sowie biochemisch charakterisiert. Insbesondere wurden die von der AMO koordinierten Metalle durch anschließende spektroskopische Methoden sowohl quantitativ als auch qualitativ im Bezug auf ihre Redoxchemie hin untersucht. Die Aufklärung der Koordination der Metalle innerhalb des Proteinkomplexes war ebenfalls ein Bestandteil dieser Arbeit. Durch physiologische Untersuchungen an der gereinigten AMO wurde zudem die Enzymaktivität analysiert und darauf basierend AMO-spezifische enzymkinetische Parameter ermittelt. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, den Ammoniak- bzw. Ammoniumtransport sowie dessen Speicherung in *N. europaea* durch Verwendung radiochemischer Methoden eingehend aufzuklären. Um Aufschluss über die Regulation der verschiedenen Stoffwechselwege zu erhalten, wurde das Transkriptionsmuster von *N. europaea* unter oxischen als auch anoxischen Bedingungen analysiert und miteinander verglichen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erweitern und verändern das derzeit bestehende Modell des Energiestoffwechsels der Ammoniak-oxidierenden Bakterien maßgeblich. Die hierbei neu gewonnen Einblicke ermöglichen zudem ein besseres biochemisches und physiologisches Verständnis der Energiegewinnung von *N. europaea*.

## 4 Synopsis

### 4.1 Eine lösliche Form der AMO aus *N. europaea*

Die AMO, Katalysator der Oxidation von Ammoniak zu Hydroxylamin, ist bezüglich ihrer Struktur, ihres Katalysemechanismus als auch ihrer Kofaktoren nur unzureichend charakterisiert. Selbst die subzelluläre Lokalisation des Enzyms wird kontrovers diskutiert (Hooper & DiSpirito, 1985; Hooper et al., 1997; Schmidt & Bock, 1998; Whittaker et al., 2000). Die meisten Arbeitsgruppen beschreiben die AMO aus *N. europaea* jedoch als ein membranassoziertes oder membranintegrales Protein (Hyman & Wood, 1985; Hyman & Arp, 1993; McTavish et al., 1993a; Hooper et al., 1997). Diese Behauptung begründet sich größtenteils auf bioinformatischen Analysen des Genoms von *N. europaea* oder auf Homologievergleichen mit der funktionell und strukturell gut aufgeklärten pMMO der methylo trophen Bakterien (Zahn & DiSpirito, 1996; Hooper et al., 1997; Arp et al., 2002; Arp & Stein, 2003; Schmidt & Jetten, 2004; Lieberman & Rosenzweig, 2005; Balasubramanian & Rosenzweig, 2007; Hakemian et al., 2008; Rosenzweig, 2008). Die pMMO besitzt aufgrund ihrer 42 parallel zueinander angeordneten transmembranspannenden  $\alpha$ -Helices eine membranintegrale Struktur (14 transmembranspannenden  $\alpha$ -Helices pro  $\alpha\beta\gamma$ -Protomer; Abb. 5; Lieberman & Rosenzweig, 2005). Für einen hypothetischen AmoC-AmoA-AmoB-Proteinkomplex ( $\alpha\beta\gamma$ -Protomer) konnten basierend auf Hydropathiediagrammen ebenfalls 12-14 Transmembrandomänen ermittelt werden (McTavish et al., 1993a; Bergmann & Hooper, 1994; Hooper et al., 1997; Klotz et al., 1997). Weiterhin kodiert *amoB* für eine hydrophobe Signalsequenz, welche für die Membranintegration von AmoB verantwortlich sein könnte (McTavish et al., 1993a; Hyman & Arp, 1993; Hooper et al., 1997; Arp et al., 2002; Chain et al., 2003). Hyman & Wood (1985) konnten zudem das AmoA-Polypeptid in Membranfraktionen von *N. europaea* nachweisen, nachdem sie es selektiv mit radioaktivem [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetylen markiert hatten.

Messungen der anaeroben Ammoniakoxidationsaktivität in subzellulären Fraktionen von *N. eutropha* deuteten jedoch erstmalig auf die Existenz einer löslichen AMO in AOBs hin (Schmidt & Bock, 1998). Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden subzelluläre Fraktionen von *N. europaea* im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Ammoniakoxidationsaktivität hin untersucht (Gilch et al., 2009a). In Membran- und Cytoplasmafraktion konnten dabei ähnliche spezifische und gesamte Ammoniakoxidationsaktivitäten beobachtet werden (Tab. 1).

**Tabelle 1:** Spezifische und gesamte Ammoniakoxidationsaktivitäten in intakten Zellen und subzellulären Fraktionen von *N. europaea* (Gilch et al., 2009a). Die Ammoniakoxidationsaktivität konnte in allen Fraktionen durch die Zugabe von Acetylen gehemmt werden. Durch Zugabe von [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetylen konnte selektiv die 27 kDa schwere AmoA-Untereinheit markiert werden. Als Elektronendonator wurde Durochinol verwendet. Die in der Tabelle angeführten Werte repräsentieren den Durchschnitt aus fünf unabhängig durchgeführten Messungen (SD:  $\pm 15\%$ ).

| Fraktion                  | Spezifische<br>Ammoniakoxidationsaktivität<br>[nmol $\text{NH}_3$ (mg Protein $^{-1}$ ) min $^{-1}$ ] | Gesamte Ammoniak-<br>oxidationsaktivität<br>( $\mu\text{mol NH}_3$ min $^{-1}$ ) |
|---------------------------|---|--|
| Intakte Zellen            | 89.1 $\pm$ 8.6  | 89.1 $\pm$ 8.6   |
| Zellfreier Rohextrakt     | 11.2 $\pm$ 2.2  | 9.0 $\pm$ 1.8  |
| Membranfraktion           | 5.8 $\pm$ 1.8   | 2.6 $\pm$ 0.8  |
| Lösliche Fraktion         | 6.5 $\pm$ 1.5   | 1.9 $\pm$ 0.4  |
| Periplasmatische Fraktion | n.d.  | n.d.   |

n.d.: nicht detektierbar bei einer Nachweisgrenze von 0.05 nmol  $\text{NH}_3$  (mg Protein $^{-1}$ ) min $^{-1}$ .

In der periplasmatischen Fraktion konnte hingegen keine Ammoniakoxidationsaktivität nachgewiesen werden. Die gemessene Ammoniakoxidationsaktivität in der Cytoplasma- und Membranfraktion betrug weniger als 10 % der Aktivität in ganzen Zellen. Dies entspricht den Berichten von Suzuki & Kwok (1970), Ensign et al. (1993) und Juliette et al. (1995). Mit zunehmender Zeit sanken die jeweiligen Aktivitäten und spätestens acht Stunden nach dem Zellaufschluss konnte in den verschiedenen Fraktionen keine Ammoniakoxidationsaktivität mehr nachgewiesen werden (Suzuki & Kwok, 1970, Ensign et al., 1993; Gilch et al., 2009a). Der genaue Grund des Aktivitätsverlustes ist allerdings unbekannt. Es wird vermutet, dass die Instabilität der Aktivität durch einen Verlust von Kupfer aus dem katalytischen Zentrum der AMO verursacht wird (Ensign et al., 1993). Durch Zugabe von aktivitätsstabilisierenden Substanzen wie BSA (bis zu 10 mg ml $^{-1}$ ), Spermin (2 mM) und  $\text{CuCl}_2$  (bis zu 0,5 mM) gelang es uns den Aktivitätsverlust in subzellulären Fraktionen deutlich zu verlangsamen. Diese Substanzen konnten jedoch im Laufe dieser Arbeit nicht zur Stabilisierung der Ammoniakoxidationsaktivität verwendet werden, da sie eine Reinigung des Enzyms erschweren, beziehungsweise unmöglich machen würden. Es war indes möglich durch Zugabe von 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; ein Inhibitor von Serin-Proteasen) die Ammoniakoxidationsaktivität in zellfreien Extrakten in geringem Maße zu konservieren. Die Zugabe von PMSF reichte allerdings nicht aus, um die Aktivität über die Zeitspanne der AMO-Reinigung aufrechtzuerhalten.



Um neben der Verteilung der Ammoniakoxidationsaktivitäten auch Aussagen über die Verteilung der AMO zwischen Membran- und Cytoplasmafraktion treffen zu können, wurden Inhibitorstudien mit radioaktivem [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetylen durchgeführt (Tab. 2; Gilch et al., 2009a). Acetylen ist ein irreversibler substratanaloger Hemmstoff der AMO und bindet selektiv in einem Verhältnis von 1:1 an die AmoA-Untereinheit der katalytisch aktiven AMO (Hynes & Knowles, 1978; Hyman & Wood, 1985; Schmidt et al., 2001a; Gilch et al., 2009b). Aufgrund dieser Eigenschaften ist [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetylen ein qualitativ und quantitativ einsetzbarer Marker, um sowohl Aufschluss über die Lokalisation und Verteilung der katalytisch aktiven AMO in *N. europaea* zu erhalten (Tab. 2, Gilch et al., 2009a), als auch die AMO während einer chromatographischen Reinigung zu identifizieren.

**Tabelle 2:** Verteilung von [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetylen markierter AMO in intakten Zellen und subzellulären Fraktionen von *N. europaea* (Gilch et al., 2009a). Das verwendete [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetylen war uniform an jeweils einem der beiden C-Atome  $^{14}\text{C}$ -markiert. Die in der Tabelle angeführten Werte repräsentieren den Durchschnitt aus fünf unabhängig durchgeführten Messungen (SD:  $\pm 15\%$ ).

|                       | Gesamtprotein |                  | Gesamtradioaktivität |                  |
|-----------------------|---------------|------------------|----------------------|------------------|
|                       | (mg)          | (%)              | (nCi)                | (%)              |
| Intakte Zellen        | 3,85          | 100 <sup>a</sup> | 51,1                 | 100 <sup>a</sup> |
| Zellfreier Rohextrakt | 2,71          | 70,4             | 36,3                 | 71,0             |
| Membranfraktion       | 1,51          | 39,2             | 18,7                 | 36,6             |
| Lösliche Fraktion     | 1,03          | 26,8             | 15,1                 | 29,5             |

<sup>a</sup> Die gemessene Proteinmenge und Radioaktivität von intakten Zellen wurde jeweils auf 100 % gesetzt.

Basierend auf den in Tabelle 2 aufgeführten Radioaktivitäten in Membran- und Cytoplasmafraktion ist 45 % der katalytisch aktiven AMO löslich und 55 % membran-gebunden. Dieses Ergebnis stimmt mit der Verteilung der Ammoniakoxidationsaktivitäten (Tab. 1; 42 % in der Cytoplasmafraktion, 58 % in der Membranfraktion; Gilch et al., 2009a) überein. Es konnte eine gleiche Radioaktivitäts- und Proteinverteilung ermittelt werden, wenn *N. europaea*-Zellen durch Lysozym/EDTA mechanisch schonend aufgeschlossen wurden. Eine durch milde Detergenzien (Undecyl- $\beta$ -D-Maltosid, CHAPS, TWEEN 20) verursachte Solubilisierung von membrangebundener AMO konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Beide Ergebnisse zeigen, dass die als löslich charakterisierte AMO (Tab. 1 und 2; Gilch et al., 2009a) nicht membranassoziiert vorliegt, und damit nicht durch mechanische Scherkräfte

beim Zellaufschluss oder durch chemische Beeinflussungen im Zuge der Präparation zellfreier Extrakte abgelöst wird.

#### 4.1.1 Molekulare Masse und Untereinheitenstruktur der löslichen AMO

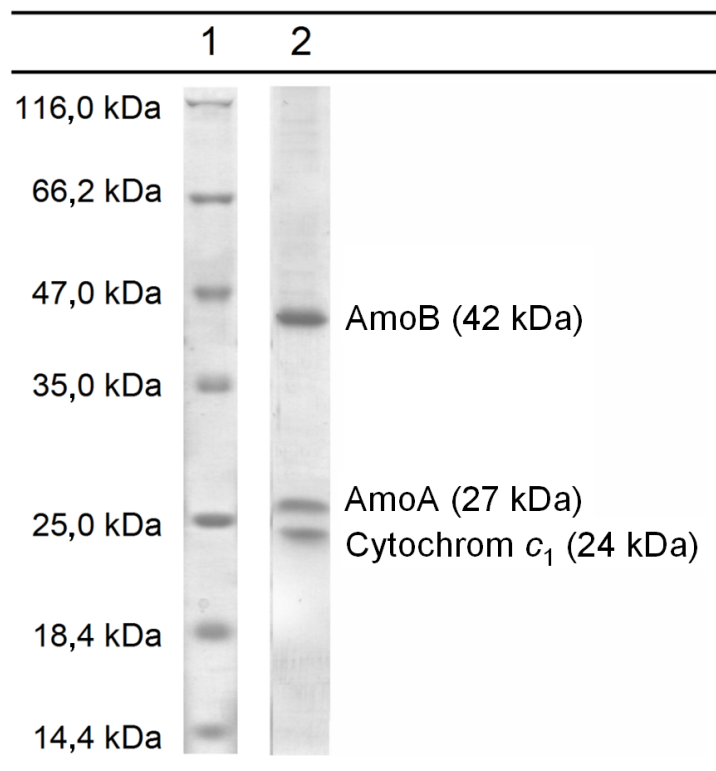
Im Zuge dieser Arbeit konnte ein Protokoll zur Reinigung der löslichen AMO entwickelt werden. Mittels verschiedener chromatographischer Trennmethode konnte die lösliche Form der AMO mit einer Reinheit von mehr als 97 % isoliert werden (Tab. 3; Abb. 7; Gilch et al., 2009a). Die Ausbeute belief sich dabei auf 4 % in Bezug auf die gesamte AMO von *N. europaea* (lösliche und membrangebundene AMO) und damit auf etwa 8 % in Bezug auf die lösliche AMO (Tab. 3).

**Tabelle 3:** Reinigungstabelle für die Isolierung der löslichen Form der AMO aus *N. europaea* (Gilch et al., 2009a). Die Fraktionen, welche die lösliche AMO enthielten, wurden mittels SDS-PAGE densitometrisch analysiert. Durch Integration der Peakflächen der AMO-Untereinheiten wurde der AMO-Anteil am Gesamtprotein der jeweiligen Fraktion errechnet. Alle in der Tabelle aufgeführten Werte repräsentieren den Zustand nach der jeweiligen Reinigungsstufe. Dieses Protokoll wurde sowohl für die Reinigung unmarkierter als auch durch [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetylen markierter AMO verwendet.

|  | Vol.<br>(ml) | Protein-<br>konz.<br>(mg ml <sup>-1</sup> ) | Protein<br>insg.<br>(mg) | AMO<br>(mg)        | AMO-<br>Anteil<br>(%) | Reinigung<br>(-fach) | Ausbeute<br>(%)  |
|--|--------------|---|--------------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|------------------|
| Zellfreier Rohextrakt  | 210          | 18,2  | 3822,0                   | 313,8 <sup>a</sup> | 8,2 <sup>a</sup>      | 1,0                  | 100 <sup>a</sup> |
| Ultrazentrifugation (Überstand)  | 185          | 7,1   | 1313,5                   | 155,2              | 11,8                  | 1,4                  | 49               |
| Anionenaustauscher-<br>chromatographie   | 144          | 1,4   | 201,6                    | 78,5               | 38,9                  | 4,7                  | 25               |
| Kationenaustauscher-<br>chromatographie  | 162          | 0,7   | 113,4                    | 54,6               | 48,1                  | 5,9                  | 17               |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung(30% w/v)<br>und hydrophobe Interaktions-<br>chromatographie | 360          | 0,2   | 72,0                     | 42,7               | 59,3                  | 7,2                  | 14               |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung (40% w/v)<br>und Gelfiltration                              | 4            | 2,9   | 11,6                     | 11,3               | 97,4                  | 11,9                 | 4                |

<sup>a</sup> lösliche und membrangebundene AMO

Die lösliche Form der AMO besteht in *N. europaea* aus den drei Untereinheiten AmoA (gi\_30248947, gi\_30250003), AmoB (gi\_30248946, gi\_30250002) und Cyt  $c_1$  (Cytochrom  $c_1$ ; gi\_30248815), welche nicht kovalent durch Disulfidbrücken verbunden sind. AmoA, AmoB und Cyt  $c_1$  sind dabei in einer Stöchiometrie von 1,2:1,1:1,0 am Aufbau des nativen AMO-Komplexes beteiligt sind (Abb. 7). Die Identität der Untereinheiten AmoA (27 kDa,) AmoB (42 kDa) und Cyt  $c_1$  (24 kDa) wurde mittels Maldi-Tof-Analysen verifiziert (Gilch et al., 2009a).



**Abbildung 7:** SDS-PAGE von gereinigter löslicher AMO (Gilch et al., 2009a). Bahn 1: molekularer Massenstandard; Bahn 2: gereinigte lösliche AMO. Die SDS-PAGE wurde ohne Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol durchgeführt. Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung visualisiert.

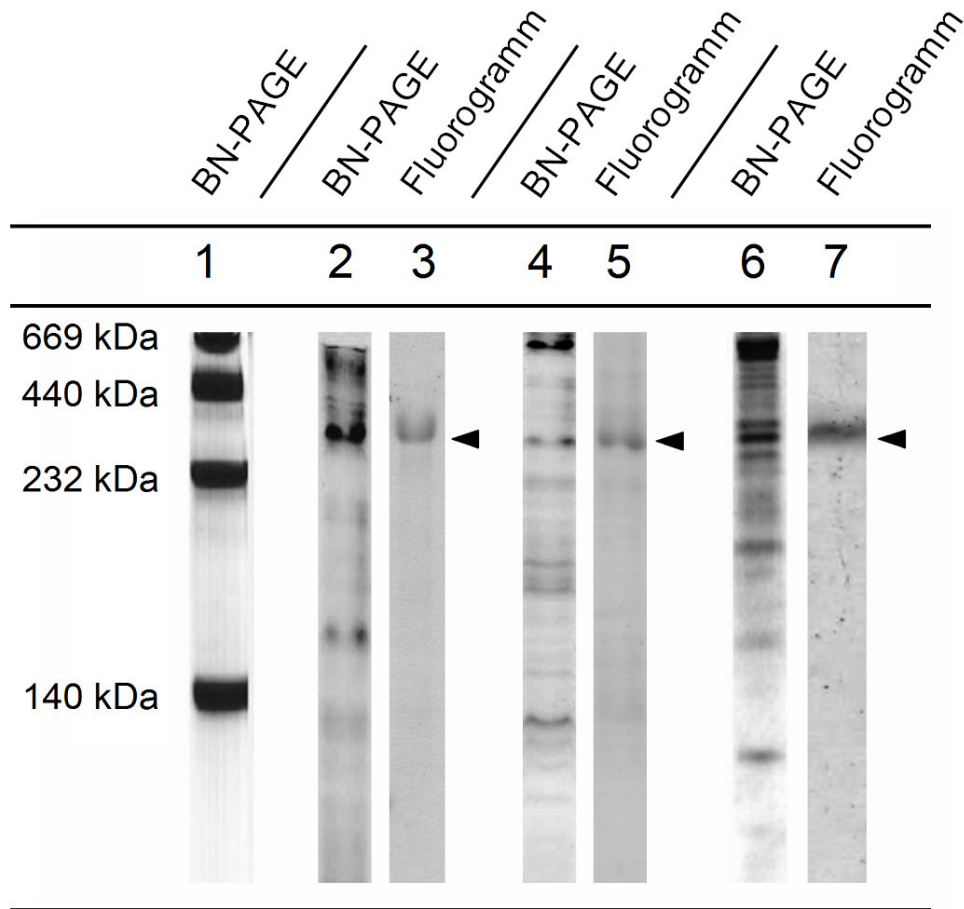
Interessanterweise konnte AmoC nicht als Untereinheit der löslichen AMO nachgewiesen werden (Abb. 7; Gilch et al., 2009a), obwohl die Clusterung der *amoCAB*-Gene dieses hätte erwarten lassen (Chain et al., 2003). Die Untereinheitenstruktur ist damit ein erster signifikanter Unterschied zur pMMO der methylo trophen Bakterien. pMMO wird durch ein *pmoCAB*-Operon kodiert und PmoC konnte als Untereinheit des Enzymkomplexes nachgewiesen werden (Nielsen et al., 1997; Lieberman & Rosenzweig, 2005). Obwohl *amoCAB* polycistronisch transkribiert wird, konnten in *N. europaea* auch mRNAs

nachgewiesen werden, welche nur die Transkripte von *amoAB* beziehungsweise *amoC* enthielten (Sayavedra-Soto et al., 1998; Hommes et al., 2001). Das Vorfinden getrennter mRNAs könnte erklären, warum AmoA und AmoB, jedoch nicht AmoC, am Aufbau des löslichen AMO Komplexes beteiligt sind (Abb. 7; Gilch et al., 2009a). Für AmoC wurde durch Klotz et al. (1997) schon früher eine Funktion als eigenständiges Chaperon vorgeschlagen. Sie vermuteten, dass AmoC die korrekte Faltung des AMO-Komplexes beziehungsweise den posttranslationalen Einbau von Metallen ermöglicht und somit keinen permanenten Bestandteil des AMO-Komplexes darstellt.

PmoB besitzt eine deutlich negativ geladene Region auf seiner äußeren Oberfläche (Lieberman & Rosenzweig, 2005). Solche Regionen sind oftmals, wie bereits sehr detailliert für die Cytochrom-*c*-Oxidase beschrieben, für eine Interaktion mit positiv geladenen Cytochromen des *c*-Typs verantwortlich (Maneg et al., 2004). Es wurde deshalb vorgeschlagen, dass ein Cytochrom des *c*-Typs die Elektronen an die PmoB-Untereinheit der pMMO überträgt (Nguyen et al., 1998; Lieberman & Rosenzweig, 2005). Da AmoB und PmoB eine hohe Sequenzidentität auf Proteinebene, besonders im Bezug auf die zahlreichen negativ geladenen Aminosäuren, aufweisen, lässt sich vermuten, dass AmoB über elektrostatische Wechselwirkungen mit Cytochrom *c*<sub>1</sub> interagiert. Weiterführend könnte dies bedeuten, dass Cytochrom *c*<sub>1</sub> den primären Elektronenakzeptor der AMO darstellt und Elektronen an die katalytischen Metallzentren in AmoB und/oder AmoA weiterleitet (siehe Kapitel 4.1.2).

Mittels nicht denaturierender PAGE (BN-PAGE) konnte für die lösliche AMO aus *N. europaea* eine apparente molekulare Masse von ~286 kDa ermittelt werden (Abb. 8; Gilch et al., 2009a). Da die Untereinheiten der AMO (AmoA =  $\alpha$ ; AmoB =  $\beta$ ; Cyt *c*<sub>1</sub> =  $\gamma$ ) etwa in einer 1:1:1 Stöchiometrie vorliegen (Abb. 7), ergibt sich eine heterotrimere  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ -Untereinheitenstruktur des nativen AMO-Komplexes. Durch Addition der aus den Gensequenzen abgeleiteten molekularen Massen der Untereinheiten AmoA (31,9 kDa), AmoB (46,7 kDa) und Cyt *c*<sub>1</sub> (26,7 kDa) errechnet sich eine molekulare Masse von 315,9 kDa, welche mit der durch BN-PAGE und Fluorographie ermittelten apparenten Masse von [<sup>14</sup>C]-Acetylen markierter AMO übereinstimmt (Abb. 8; Gilch et al., 2009a). Es wurde neben der AMO in der löslichen Fraktion auch in der Membranfraktion von *N. europaea* ein Protein radioaktiv markiert (Abb. 8). Da Acetylen selektiv nur an die AmoA-Untereinheit der AMO bindet, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um die membrangebundene Form der AMO handelt. Da sowohl lösliche als auch membrangebunden AMO gleiche molekulare Massen aufweisen (Abb. 8) kann vermutet werden, dass die

membrangebundenen Form der AMO ebenfalls eine heterotrimere  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ -Untereinheitenstruktur besitzt.



**Abbildung 8:** BN-PAGE und Fluorogramm von löslichem, membrangebundenem und gesamtem  $^{14}\text{C}$ -markierten Zellprotein aus *N. europaea* (Gilch et al., 2009a). Bahn 1: molekularer Massenstandard; Bahn 2: lösliche Proteine; Bahn 3: Fluorogramm der löslichen Proteine; Bahnen 4: Membranproteine; Bahn 5: Fluorogramm der Membranproteine; Bahn 6: Gesamtprotein; Bahn 7: Fluorogramm des Gesamtproteins. Schwarze Pfeile:  $^{14}\text{C}$ -markierte lösliche und membrangebundene AMO mit einer molekularen Masse von  $286 \pm 22$  kDa. Es blieb kein radioaktiv markiertes Protein in den Taschen des Gels zurück.

Basierend auf der  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ -Untereinheitenstruktur, einer 1:1 Stöchiometrie des kovalent an AmoA gebundenen  $[^{14}\text{C}]$ -Acetyls (siehe Kapitel 4.1.3; Gilch et al., 2009b) sowie dessen spezifischer Radioaktivität lässt sich ein Anteil der löslichen AMO am gesamten löslichen *Nitrosomonas*-Protein von 13 % errechnen. Folglich ergibt sich unter Berücksichtigung der Ammoniakoxidationsaktivität der löslichen Fraktion von *N. europaea* (Tab. 1) eine spezifische Aktivität der löslichen AMO von  $50 \pm 11,5$  nmol  $\text{NH}_3$  (mg AMO) $^{-1}$  min $^{-1}$  und ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $0,26 \pm 0,06$  s $^{-1}$  (Gilch et al., 2009a).

Mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 99 % wird durch Analyse der *amoB*-Gensequenz ein 25 Aminosäuren langes Signalpeptid, mit den dafür typischen n-, h- und c-Regionen für das AmoB-Polypeptid vorhergesagt (SignalP 3.0; Nielson & Krogh, 1998; Bendtsen et al., 2004, Gilch et al., 2009a). Wir konnten mittels N-terminaler Sequenzierung zeigen, dass im Gegensatz zur membrangebundenen AMO (N-terminale Aminosäuresequenz: MTVTLDVSTV) bei der löslichen AMO keine Abspaltung des Signalpeptids stattgefunden hat (N-terminale Aminosäuresequenz: GIKNLYKR). Die An- beziehungsweise Abwesenheit des Signalpeptids könnte nach der „membrane-trigger hypothesis“ von Wickner (1979) die Konformation der AMO so weitreichend verändern, dass daraus sowohl ein löslicher als auch ein membrangebundener AMO-Komplex resultiert. Das Signalpeptid könnte dabei die Faltung des Proteinrückgrats so stark beeinflussen, dass die für AMO prognostizierten potentiellen Membrandomänen (McTavish et al., 1993a; Bergmann & Hooper, 1994; Hooper et al., 1997; Klotz et al., 1997) sich nicht frei an der Proteinoberfläche positionieren können. Dadurch würden die hydrophoben Bereiche im Inneren des Proteins verborgen bleiben und das Protein somit seine hydrophile Konformation annehmen. Eine ähnliche Situation wurde bereits für die Enzyme L-Laktat-Dehydrogenase (Kimura & Futai, 1978) und Pyruvat-Oxidase (Schrock & Gennis, 1977) aus *Escherichia coli* beschrieben. Beide Enzyme sind dabei sowohl in der löslichen als auch in der membrangebundenen Form katalytisch aktiv.

Der substratanaloge irreversible Hemmstoff Acetylen bindet nur an katalytisch aktive AMO (Tab. 2; Hynes & Knowles, 1978; Hyman & Wood, 1985; Schmidt et al., 2001a; Gilch et al., 2009b). Da Acetylen bei *N. europaea* sowohl an die membrangebundene als auch die lösliche AMO bindet zeigt dies zweifelsfrei, dass beide Konformationen der AMO *in vivo* katalytisch aktiv sind und somit Ammoniak oxidieren (Gilch et al., 2009a). Dies bedeutet weiterhin, dass sowohl die lösliche als auch die membrangebundene AMO zugänglich für Ammoniak, Sauerstoff und Elektronen ist. Ähnlich wie Sauerstoff, kann auch Ammoniak durch passive Diffusion in das Cytoplasma Gram-negativer Bakterien gelangen (Kleiner, 1981). Zudem gelang es uns einen Ammoniaktransporter vom Rhesus-Typ in *N. europaea* zu identifizieren, welcher die Ammoniakaufnahme in das Cytoplasma signifikant beschleunigt (siehe Kapitel 4.2; Weidinger et al., 2007). Die für die Ammoniakoxidation benötigten Elektronen könnten *in vivo* entweder von einem löslichen Cytochrom bereitgestellt werden (Miller & Wood, 1982, 1983; Andersson et al., 1986) oder durch direkten Kontakt der AMO mit einem membrangebundenen Elektronendonator übertragen werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *N. europaea* sowohl eine lösliche als auch eine membrangebundene AMO besitzt. Beide Enzyme kommen in etwa den gleichen Mengen mit ähnlichen Aktivitäten

vor (Tab. 1 und 2; Gilch et al., 2009a). Es muss daher angenommen werden, dass die lösliche Form der AMO zur Gewinnung von Hydroxylamin und damit zum Energiestoffwechsel von *N. europaea* beiträgt.

#### 4.1.2 Charakterisierung der Metallzentren

Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass Metalle essentielle katalytische Bestandteile der AMO aus *N. europaea* sind (Lees, 1946; Loveless & Painter, 1968; Hooper & Terry, 1973; Shears & Wood, 1985; Bédard & Knowles, 1989; Ensign et al., 1993; Juliette et al., 1993, 1995; Zahn et al., 1996; Lieberman & Rosenzweig, 2005; Martinho et al., 2007; Tumanova et al., 2008). Um Aufschluss über die Anzahl und Natur der Metalle zu erhalten, wurde mittels ICP-MS (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma) der Metallgehalt der von uns gereinigten löslichen AMO bestimmt (Gilch et al., 2009a). Die Metallanalyse ergab, dass die lösliche Form der AMO  $9,5 \pm 1,0$  Cu-Atome,  $3,9 \pm 0,7$  Fe-Atome und  $0,45 \pm 0,1$  bis  $2,6 \pm 0,4$  Zn-Atome koordiniert (Tab. 4). Weitere biokatalytisch bedeutsamen Metalle wie Mn, Mo, Ni und W sind am Aufbau der löslichen AMO aus *N. europaea* dagegen offensichtlich nicht beteiligt (Gilch et al., 2009a).

**Tabelle 4:** Metallanalyse von unmarkierter sowie mit Acetylen markierter löslicher AMO (Gilch et al., 2009a; Gilch et al., eingereicht). Phosphatpuffer: Metallkonzentration des proteinfreien Phosphatpuffers; AMO in Phosphatpuffer: Metallkonzentration der löslichen AMO im Phosphatpuffer; Metalle pro AMO: Berechneter Metallgehalt pro AMO-Heterotrimer ( $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ ). Die in der Tabelle angeführten Werte repräsentieren den Durchschnitt aus drei unabhängig durchgeführten Messungen ( $\pm$ SD).

| Metall                                 | Unmarkierte AMO <sup>a</sup>    |                                 |                                   | Acetylen markierte AMO <sup>b</sup> |                                 |                                   |
|--|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
|  | Cu                              | Fe                              | Zn                                | Cu                                  | Fe                              | Zn                                |
| Phosphatpuffer ( $\mu$ M)              | $1,1 \pm 0,3$                   | $0,4 \pm 0,1$                   | $0,2 \pm 0,1$                     | $0,6 \pm 0,2$                       | $0,2 \pm 0,1$                   | $0,2 \pm 0,1$                     |
| AMO in Phosphatpuffer ( $\mu$ M)       | $49,7 \pm 4,7$                  | $20,7 \pm 3,4$                  | $13,6 \pm 2,3$                    | $27,8 \pm 4,1$                      | $14,3 \pm 2,5$                  | $10,8 \pm 1,3$                    |
| Metalle pro AMO (mol/mol) <sup>c</sup> | <b><math>9,5 \pm 1,0</math></b> | <b><math>3,9 \pm 0,7</math></b> | <b><math>2,6 \pm 0,4^d</math></b> | <b><math>7,1 \pm 1,0</math></b>     | <b><math>3,7 \pm 0,6</math></b> | <b><math>2,8 \pm 0,3^d</math></b> |

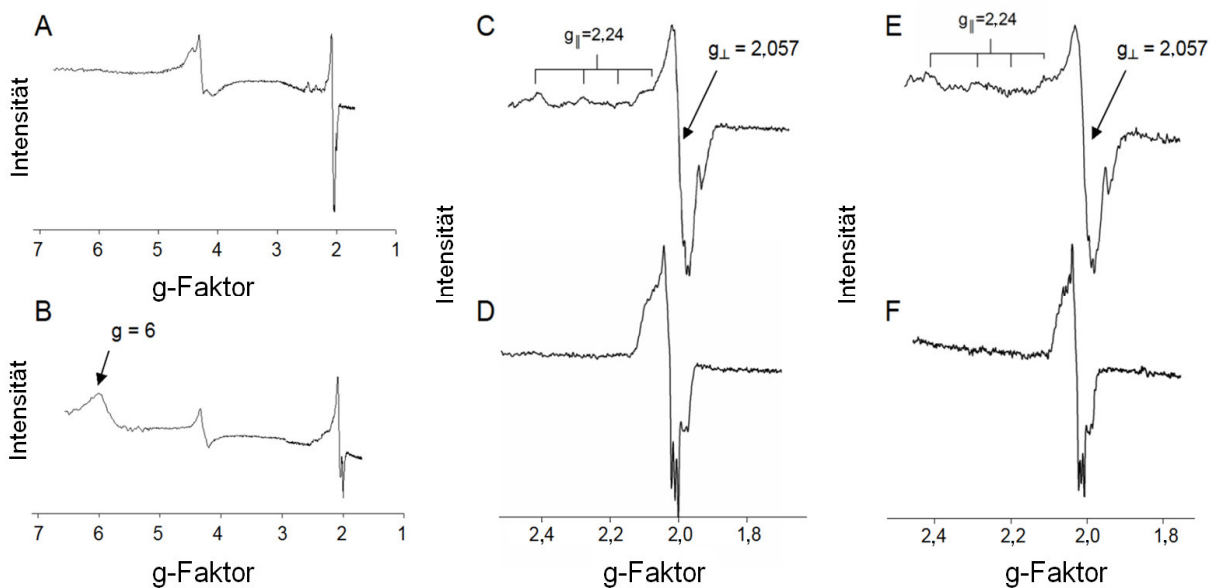
<sup>a</sup>  $1,63 \text{ mg AMO ml}^{-1}$ .

<sup>b</sup>  $1,21 \text{ mg AMO ml}^{-1}$ .

<sup>c</sup> Der Metallgehalt wurde basierend auf einer molekularen Masse von 315,9 kDa berechnet.

<sup>d</sup> Die AMO welche in einem metallfreien Puffer (ohne Cu, Fe und Zn) gereinigt wurde enthält die gleiche Menge an Cu und Fe, jedoch nur  $0,45 \pm 0,1$  Zn-Atome pro AMO.

Elektronenspinresonanz-Spektren der luftoxidierten gereinigten AMO bei 50 K weisen auf die Existenz von einem oder mehreren Typ-2-Cu(II)-Zentren hin ( $g_{\perp} = 2,057$ ;  $g_{\parallel} = 2,24$  und  $|A_{\parallel}| = 18,4$  mT; Abb. 9A,C,E; Gilch et al., 2009a). Ähnliche Spektren weist die kupferhaltige pMMO von den methylo trophen Bakterien *M. capsulatus* (Bath) (Nguyen et al., 1994; Nguyen et al., 1996; Zahn & DiSpirito, 1996), *Methylosinus trichosporium* OB3b (Takeguchi & Okura 2000; Hakemian & Rosenzweig, 2008) und *Methylobacterium album* BG8 (Yuan et al., 1998, 1999) auf. Bei allen drei Methan-Monooxygenasen konnten durch ESR-Spektroskopie jeweils ein oder mehrere Typ-2-Cu(II)-Zentren identifiziert werden.

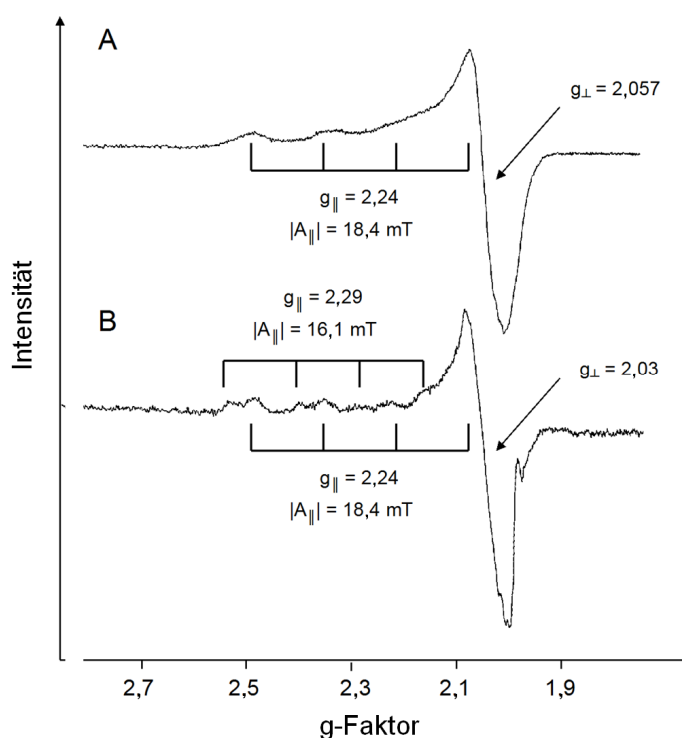


**Abbildung 9:** X-Band ESR-Spektren von löslicher AMO (Gilch et al., 2009a). Spektren luftoxidiertter AMO bei 50 K (A) und 10 K (B). Typ-2-Cu(II) Signal ( $g_{\perp} = 2,057$ ;  $g_{\parallel} = 2,24$ ) der luftoxidierten AMO bei 50 K (C) und entsprechendes Spektrum nach Reduktion mit 5 mM DT (D); (E, F): Wie bei (C) und (D), jedoch mit Acetylen-gehemmter löslicher AMO. Die Spektren wurden zwecks besserer Vergleichbarkeit normalisiert. Alle ESR-Messungen wurden mit folgenden Parametern durchgeführt: Modulationsfrequenz 100 kHz; Modulationsamplitude 10 G; Zeitkonstante 40 ms. Die Mikrowellenfrequenz betrug 9,474 GHz bei einer Energie von 10 mW.

Doppelte Spinintegration des zum Typ-2-Cu(II)-Zentrum gehörenden Signals und dessen Abgleich mit dem Signal einer geeichten Kupferperchlorat-Lösung (1 mM) ergab, dass sich sechs der neun Kupferatome (Tab. 4) des löslichen AMO-Komplexes ( $\alpha_3\beta_3\gamma$ ) in der paramagnetischen  $\text{Cu}^{2+}$ -Form befinden. Die verbleibenden drei Kupferatome befinden sich dagegen in ihrem diamagnetischen, nicht durch ESR-Spektroskopie detektierbaren,  $\text{Cu}^{1+}$ -Zustand (Gilch et al., 2009a). Durch eine Oxidation mittels Eisenhexacyano(III)ferrat



[K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] konnten die diamagnetischen Cu<sup>1+</sup>-Atome nahezu vollständig in den paramagnetischen Cu<sup>2+</sup>-Zustand überführt werden (8,8 Cu<sup>2+</sup> pro löslicher AMO; Abb. 10; Gilch et al., eingereicht). Dieser Wert stimmt weitestgehend mit dem Gesamtkupfergehalt der löslichen AMO überein, welcher mittels ICP-MS-Analyse bestimmt werden konnte (Tab. 4).



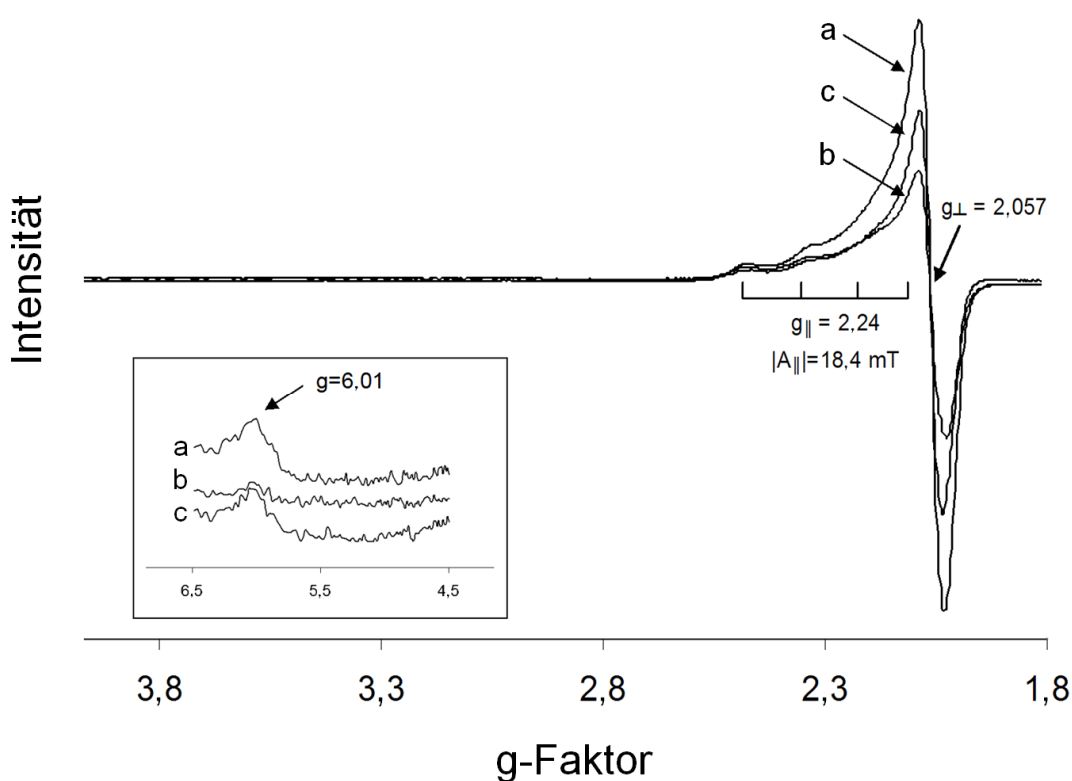
**Abbildung 10:** X-Band ESR-Spektren von A: luftoxidiertem löslichem AMO und B: durch 2 mM Eisenhexacyano(III)ferrat [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] oxidiertem löslichem AMO (Gilch et al., eingereicht). Zusätzlich zu dem in (A) und (B) erkennbaren Typ-2-Cu(II) Signal mit  $g_{\perp} = 2,057$ ;  $g_{\parallel} = 2,24$ ;  $|A_{\parallel}| = 18,4$  mT erscheint in (B) ein zusätzliches Typ-2-Cu(II) Signal mit  $g_{\perp} = 2,03$ ;  $g_{\parallel} = 2,29$  und  $A_{\parallel} = 16,1$  mT. Die Spektren wurden zwecks besserer Vergleichbarkeit normalisiert. Die ESR-Messungen wurden mit folgenden Parametern durchgeführt: Temperatur 50 K; Modulationsfrequenz 100 kHz; Modulationsamplitude 10 G; Zeitkonstante 40 ms. Die Mikrowellenfrequenz betrug 9,474 GHz bei einer Energie von 10 mW.

Die vollständige Oxidation der löslichen AMO durch Eisenhexacyano(III)ferrat führt neben der Oxidation der durch die AMO koordinierten Cu<sup>1+</sup>-Atome ferner zum Auftreten eines zweiten leicht veränderten Typ-2-Cu(II) Signals mit  $g_{\perp} = 2,03$ ;  $g_{\parallel} = 2,29$  und  $A_{\parallel} = 18,4$  mT. Da dieses Signal unter luftoxidierten Bedingungen nicht erkennbar ist (Abb. 9A,C,E und 8; Gilch et al., 2009a; Gilch et al., eingereicht) und leicht veränderte Werte im Bezug auf das Typ-2-Cu(II) Signal von der luftoxidierten AMO ( $g_{\perp} = 2,057$ ;  $g_{\parallel} = 2,24$  und  $|A_{\parallel}| = 18,4$  mT)

aufweist, kann davon ausgegangen werden, dass die drei in der löslichen AMO koordinierten  $\text{Cu}^{1+}$ -Atome ein oder mehrere verschiedene Bindungsliganden aufweisen als die restlichen sechs  $\text{Cu}^{2+}$ -Atome. Das Auftreten des zweiten Typ-2-Cu(II) Signals kann demnach entweder durch die Oxidation eines mononuklearen  $\text{Cu}^{1+}$ -Zentrums verursacht werden oder auch aus der Oxidation eines dinuklearen  $\text{Cu}^{1+}$ - $\text{Cu}^{2+}$ -Zentrums zu einem dinuklearen  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{Cu}^{2+}$ -Zentrum resultieren. Weiterhin ist ersichtlich, dass die  $\text{Cu}^{1+}$ -Atome resistent gegenüber der Oxidation durch molekularem Sauerstoff sind, und nur durch die Zugabe des Oxidationsmittels Eisenhexacyano(III)ferrat oxidiert werden können. Interessant ist auch, dass die  $\text{Cu}^{1+}$ -Atome, nachdem sie durch Eisenhexacyano(III)ferrat in den  $\text{Cu}^{2+}$ -Zustand oxidiert wurden, am Enzym gebunden bleiben. Die feste Koordination von sowohl  $\text{Cu}^{1+}$  als auch  $\text{Cu}^{2+}$  deutet auf eine Beteiligung des  $\text{Cu}^{1+}$ -Zentrums an redoxaktiven Vorgängen, wie zum Beispiel dem Transfer von Elektronen oder der metallkatalysierten Substratumsetzung, hin.

Die Bindung von Acetylen beeinflusst die ESR-Spektren von luftoxidierte und DT-reduzierte löslicher AMO nicht signifikant (Abb. 9E,F; Gilch et al., 2009a). Diese Beobachtung legt nahe, dass die kovalente Anbindung von Acetylen nicht in unmittelbarer Nähe zu einem  $\text{Cu}^{2+}$ -Zentrum erfolgt. Da sich jedoch die Acetylen-gebundene lösliche AMO deutlich im Gesamtkupfergehalt ( $\text{Cu}^{1+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$ ) von der unmarkierten AMO unterscheidet (Tab. 4; Gilch et al., 2009a; Gilch et al., eingereicht), ist davon auszugehen, dass die Anbindung von Acetylen eine Freisetzung von diamagnetischen  $\text{Cu}^{1+}$ -Atomen bewirkt. Der durch die Acetylenbindung hervorgerufene irreversible Verlust von  $\text{Cu}^{1+}$ -Atomen könnte demnach für die Inaktivierung der löslichen AMO verantwortlich sein. Um detailliertere Aussagen über die Bindungsaffinitäten zwischen den Kupferatomen und der löslichen AMO treffen zu können, wurde die lösliche AMO mit  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  versetzt, welches schwach gebundene zweiwertige Kationen (wie z. B.  $\text{Cu}^{2+}$ ) zu chelatieren vermag. Die Zugabe von EDTA verringerte die  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration pro löslicher AMO von 6,5 auf 3,1 sowie die Konzentration der insgesamt gebundenen Kupferatome ( $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{1+}$ ) von 9,5 auf 6,1 (Abb. 11a,b; Gilch et al., eingereicht). Es wurden somit in etwa drei schwach gebundene  $\text{Cu}^{2+}$ -Atome durch Zugabe von EDTA aus dem Enzym herausgelöst. Die in der AMO verbliebenen drei  $\text{Cu}^{2+}$ -Atome sind demnach vor EDTA geschützt. Der Verbleib von drei  $\text{Cu}^{2+}$ -Atomen könnte durch eine sterische Abschirmung der  $\text{Cu}^{2+}$ -Atome vom Lösungsmittel oder auch durch eine starke Bindung jener  $\text{Cu}^{2+}$ -Atome an die AMO begründet sein. Eine anschließende vollständige Rekonstruktion der Kupferzentren durch Zugabe von 0,5 mM  $\text{CuCl}_2$  war nicht möglich. Die Anzahl der von der AMO gebundenen Kupferatome konnte

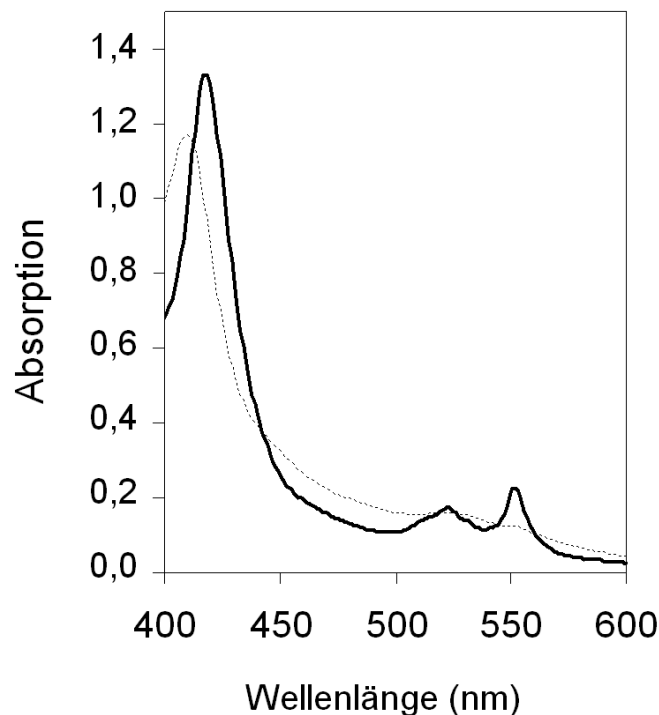
durch Resupplementation von  $\text{Cu}^{2+}$  lediglich von 3,1 auf 4,1 erhöht werden (Abb. 11c; Gilch et al., eingereicht). Dieses Ergebnis könnte einen Hinweis darauf liefern, dass der Einbau von Kupferatomen in die AMO entweder vor der eigentlichen Faltung des Proteins erfolgt, oder dass zum Einbau von Kupfer weitere Proteine benötigt werden, welche in gereinigten AMO-Präparationen nicht vorhanden sind. Als solche Proteine kommen zum Beispiel Chaperone, welche die partielle Entfaltung des AMO-Komplexes für den Kupfereinbau ermöglichen und/oder Kupferchelatasen, welche den gezielten Transport von  $\text{Cu}^{1+}$ - beziehungsweise  $\text{Cu}^{2+}$ -Atomen an das aktive Zentrum der AMO katalysieren, in Frage.



**Abbildung 11:** X-Band ESR-Spektren von a: luftoxidiertes AMO; b: luftoxidiertes AMO nach Zugabe von 2 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ; c: nach anschließender Zugabe von 0,5 mM  $\text{CuCl}_2$  (Gilch et al., eingereicht). Die Einrahmung zeigt das high-spin Fe(III)-Signal bei  $g = 6,01$ . Überschüssiges EDTA beziehungsweise ungebundenes  $\text{Cu}^{2+}$  wurde vor den jeweiligen Messungen durch Gelfiltration entfernt. Alle ESR-Messungen wurden mit folgenden Parametern durchgeführt: Temperatur: 50 K; Modulationsfrequenz 100 kHz; Modulationsamplitude 10 G; Zeitkonstante 40 ms. Die Mikrowellenfrequenz betrug 9,474 GHz bei einer Energie von 10 mW.

Das Absorptionsspektrum der DT-reduzierten löslichen AMO besitzt im sichtbaren Bereich des Spektrums einen für Cytochrome des c-Typs typischen Verlauf (Abb. 12; Gilch et al.,

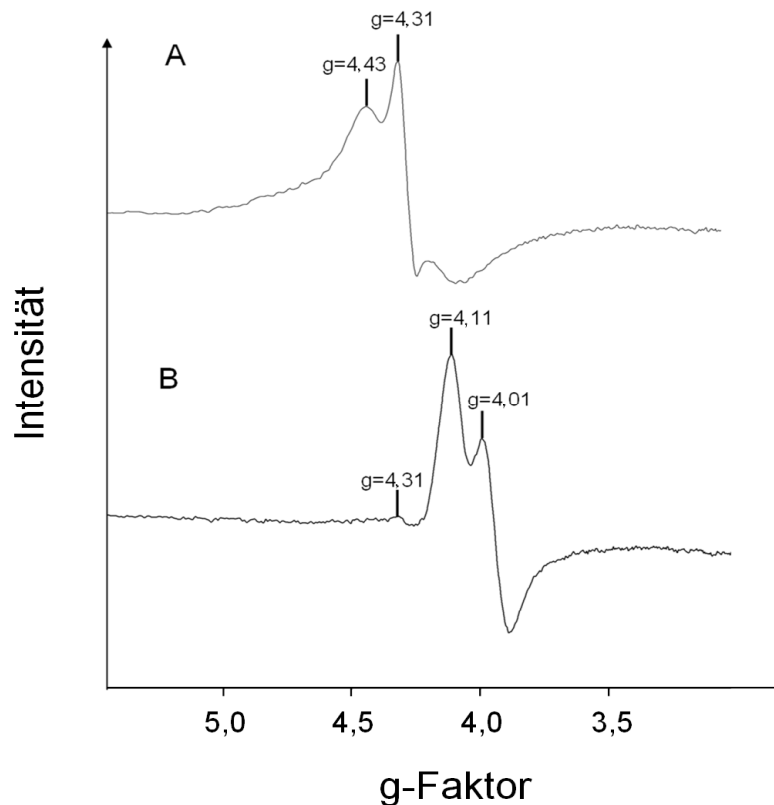
2009a). Im reduzierten Zustand sind die für Cytochrome des *c*-Typs charakteristischen Banden bei 552 nm ( $\alpha$ -Peak), 522 nm ( $\beta$ -Peak) und 419 nm ( $\gamma$ -Peak) erkennbar (Lemberg & Barrett, 1973). Basierend auf der Pyridin-Hämochromogen-Methode (Yamanaka & Shinra, 1974) konnte ein Gehalt an Häm-gebundenem Fe bestimmt werden, welcher mit 2,7 Häm-Fe weitgehend sowohl mit der Untereinheitenstruktur der AMO (drei monohäm-Cytochrome  $c_1$  pro löslicher AMO) als auch dem mittels ICP-MS-Analyse bestimmten Wert übereinstimmt (Tab. 4, Gilch et al., 2009a).



**Abbildung 12:** Absorptionsspektrum der gereinigten löslichen AMO (Gilch et al., 2009a). Die AMO wurde mittels Luftsauerstoff oxidiert (dünne Linie) oder mittels Dithionit (DT) reduziert (dicke Linie). Die Konzentration der AMO betrug jeweils  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ .

Die Existenz von Häm-gebundenem Fe konnte zusätzlich mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden (Abb. 9B, Gilch et al., 2009a). Die luftoxidierte lösliche AMO erzeugt im ESR-Spektrum bei einer Temperatur von 10 K ein für Hämgruppen typisches rhombisches Signal bei  $g = 6,01$ . Durch doppelte Spinintegration des rhombischen Signals und dessen Vergleich mit einem Ferritin-Standard konnte ein Wert von 2,9 Häm-gebundenen Fe(III)-Atomen im high-spin Zustand ermittelt werden. Weiterhin war es durch ESR-Spektroskopie möglich, nicht an Häm-gebundenes Fe(III) nachzuweisen. Nach Inkubation DT-reduzierter

löslicher AMO mit NO konnte ein ESR-aktiver Nitrosyl-Fe-Komplex nachgewiesen werden, welcher in seinem Übergangszustand einen charakteristischen Spin von  $S = 3/2$  besitzt (Zahn et al., 1996; Arciero et al., 1983). Dieser Spin führt im ESR-Spektrum der mit NO behandelten, DT-reduzierten löslichen AMO zum Auftreten eines isotropischen Signals bei  $g = 4,01$  und eines rhombischen Signals bei  $g = 4,11$  (Abb. 13B; Gilch et al., eingereicht). Ein ähnlicher Spinzustand konnte ebenfalls für NO-behandelte pMMO aus *M. capsulatus* (Bath) (Zahn & DiSpirito, 1996) und *Methylosinus trichosporium* OB3b (Takeguchi & Okura; 2000) sowie für Protocatechuat-4,5-Dioxygenase aus *Pseudomonas testosteroni* (Arciero et al., 1983) beobachtet werden. Die für nicht an Häm gebundenes Fe(III) charakteristischen Signale bei  $g = 4,31$  (isotropisch) und bei  $g = 4,43$  (rhombisch) verschwinden nach NO-Zugabe konsequenterweise fast vollständig (Abb. 13A,B).



**Abbildung 13:** X-Band ESR-Spektren von DT-reduzierter löslicher AMO (A) und mit NO inkubierter DT-reduzierter löslicher AMO (B) (Gilch et al., eingereicht). Der Nitrosyl-Fe-Komplex in (B) besitzt einen für ihn charakteristischen Spin von  $S = 3/2$ , welcher zu einem isotropischen Signal bei  $g = 4,01$  sowie zu einem rhombischen Signal bei  $g = 4,11$  führt. Die Spektren wurden zwecks besserer Vergleichbarkeit normalisiert. Die ESR-Messungen wurden mit folgenden Parametern durchgeführt: Temperatur 77 K; Modulationsfrequenz 100 kHz; Modulationsamplitude 10 G; Zeitkonstante 40 ms. Die Mikrowellenfrequenz betrug 9,474 GHz bei einer Energie von 10 mW.

Aufgrund der Beteiligung von drei Cyt  $c_1$ -Untereinheiten am Aufbau der heterotrimeren AMO ( $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ ) lässt sich die Existenz von drei Fe-Atomen pro AMO-Komplex erklären. Mittels ICP-MS-Analyse konnten jedoch vier Fe-Atome pro AMO-Komplex bestimmt werden (Tab. 4). Die Koordination von nicht an Häm gebundenem Eisen (Abb. 13; Gilch et al., eingereicht) könnte somit den durch Metallanalyse bestimmten Gehalt von 4 Fe pro AMO erklären (Tab. 4). Martinho et al. (2007) sowie Tumanova et al. (2008) konnten für die pMMO aus *M. capsulatus* (Bath) ein dinukleares Eisenzentrum nachweisen. Beide Arbeitsgruppen schlugen vor, dass das dinukleare Eisenzentrum *in vivo* das in der Kristallstruktur von Lieberman & Rosenzweig (2005) modellierte Zink-Zentrum ersetzt. Die gereinigte lösliche AMO enthält ebenfalls signifikante Mengen an Zink (Tab. 4; 2,6 - 2,8 Zn pro AMO). Es kann daher auch für die lösliche AMO angenommen werden, dass nicht Häm-gebundenes Fe(III) durch Zink ersetzt ist. Dem zufolge könnte die lösliche AMO *in vivo* mehr spezifisch gebundenes Eisen besitzen als mittels ICP-MS-Analyse (Tab. 4) und ESR-Spektroskopie (Abb. 9B; Gilch et al., 2009a) bislang ermittelt werden konnte.

Die lösliche AMO ( $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ ) koordiniert spezifisch die Metalle Kupfer (~ 9 Cu pro AMO), Eisen (~ 4 Fe pro AMO) und Zink (~ 3 Zn pro AMO). Die AmoA-Untereinheit der AMO koordiniert jeweils ein  $\text{Cu}^{1+}$ -Atom (Abb. 9; Tab. 4; Gilch et al., eingereicht) und die Cyt  $c_1$ -Untereinheit jeweils ein Häm-gebundenes Fe(III)-Atom in seinem high-spin Zustand. Um potentielle metallbindende Motive in der löslichen AMO zu identifizieren, wurden Sequenzanalysen der Primärstrukturen der AMO-Untereinheiten durchgeführt. Die im folgenden Teil aufgeführten Untersuchungen erfolgten auf Basis der Kristallstruktur der Cu-, Fe-, und Zn-haltigen pMMO aus *M. capsulatus* (Bath) (Lieberman & Rosenzweig, 2005). pMMO besitzt eine hohe Sequenzhomologie zur AMO auf Gen- und Proteinebene und katalysiert unter anderem auch die Oxidation von Ammoniak (Hooper & Terry, 1973; Stirling & Dalton, 1977; Prior & Dalton, 1985).

Die AmoA Untereinheit der löslichen AMO besitzt bezüglich der PmoA Untereinheit der pMMO aus *M. capsulatus* (Bath) eine Sequenzidentität von mehr als 43 % (Lieberman & Rosenzweig, 2005). Da Acetylen durch katalytische Metalle aktiviert werden muss, um in der Folge kovalent an das AmoA-Polypeptid zu binden (Hyman & Wood, 1985; Hyman & Arp 1992; Schmidt et al., 2001a, Gilch et al., 2009a,b), ist anzunehmen, dass AmoA mindestens ein katalytisches Metallzentrum besitzt. Das Motiv Asp 187 - X<sub>3</sub> - His 191 - X<sub>12</sub> - His 204 aus AmoA ist dabei ein möglicher Kandidat für die Koordination von Metallen, da es dem metallbindenden Motiv Asp 156 - X<sub>3</sub> - His 160 - X<sub>12</sub> - His 173 der PmoC-Untereinheit ähnelt (Lieberman & Rosenzweig, 2005). Da es sich bei der physiologischen Reaktion der AMO um

eine Monooxygenierung handelt, besteht die Möglichkeit, dass dieses Motiv aus AmoA an der Koordination eines mono-, di- oder trinuklearen Kupferzentrums beteiligt ist (Fomina et al., 2002; Chan et al., 2004; Chen & Solomon, 2004; Chen & Chan, 2006; Chen et al., 2007). Weiterhin könnte das Motiv His 43 - X<sub>1</sub> - His 45 eine Kupferkoordination ermöglichen, da sowohl Aminoxidase aus *Arthrobacter globiformis* (Wilce et al., 1997) als auch pMMO aus *M. capsulatus* (Bath) (Lieberman & Rosenzweig, 2005) jenes Motiv nutzt, um Kupfer spezifisch zu koordinieren. Basierend auf diesen Untersuchungen kann jedoch nicht unterschieden werden, ob die potentiell metallbindenden Motive in AmoA an der Koordinierung von Cu<sup>1+</sup> oder Cu<sup>2+</sup> beteiligt sind.

Die AmoB Untereinheit der löslichen AMO weist bezüglich der PmoB-Untereinheit der pMMO aus *M. capsulatus* (Bath) eine Sequenzidentität von über 41 % auf. PmoB enthält *in vitro* sowohl ein dinukleares als auch ein mononukleares Kupferzentrum (Lieberman & Rosenzweig, 2005; Balasubramanian & Rosenzweig, 2007). Die beiden Kupferatome des dinuklearen Zentrums werden dabei von dem Motiv His 33 - X<sub>103</sub> - His 137 - X<sub>1</sub> - His 139 koordiniert und durch die hydrophobe Aminosäure Trp 156 vom polaren Lösungsmittel abgeschirmt (Lieberman & Rosenzweig, 2005). Ein ähnliches Motiv ist mit His 38 - X<sub>103</sub> - His 142 - X<sub>1</sub> - His 144 sowie Trp 161 auch in der AmoB-Untereinheit vorzufinden, was auf die Existenz eines dinuklearen Metallzentrums hindeutet. Das Kupferatom des mononuklearen Kupferzentrums von PmoB wird durch das Motiv His 48 - X<sub>23</sub> - His 72 - X<sub>331</sub> - Gln 404 koordiniert. Interessanterweise sind gleich zwei entsprechende Motive (His 77 - X<sub>35</sub> - His 113 - X<sub>264</sub> - Gln 378 und Gln 53 - X<sub>23</sub> - His 77 - X<sub>327</sub> - His 405) in AmoB vorhanden. Aufgrund der Ähnlichkeit zum Motiv aus PmoB sind beide Motive potentielle Kandidaten für eine Koordination von mononuklearen Metallen.

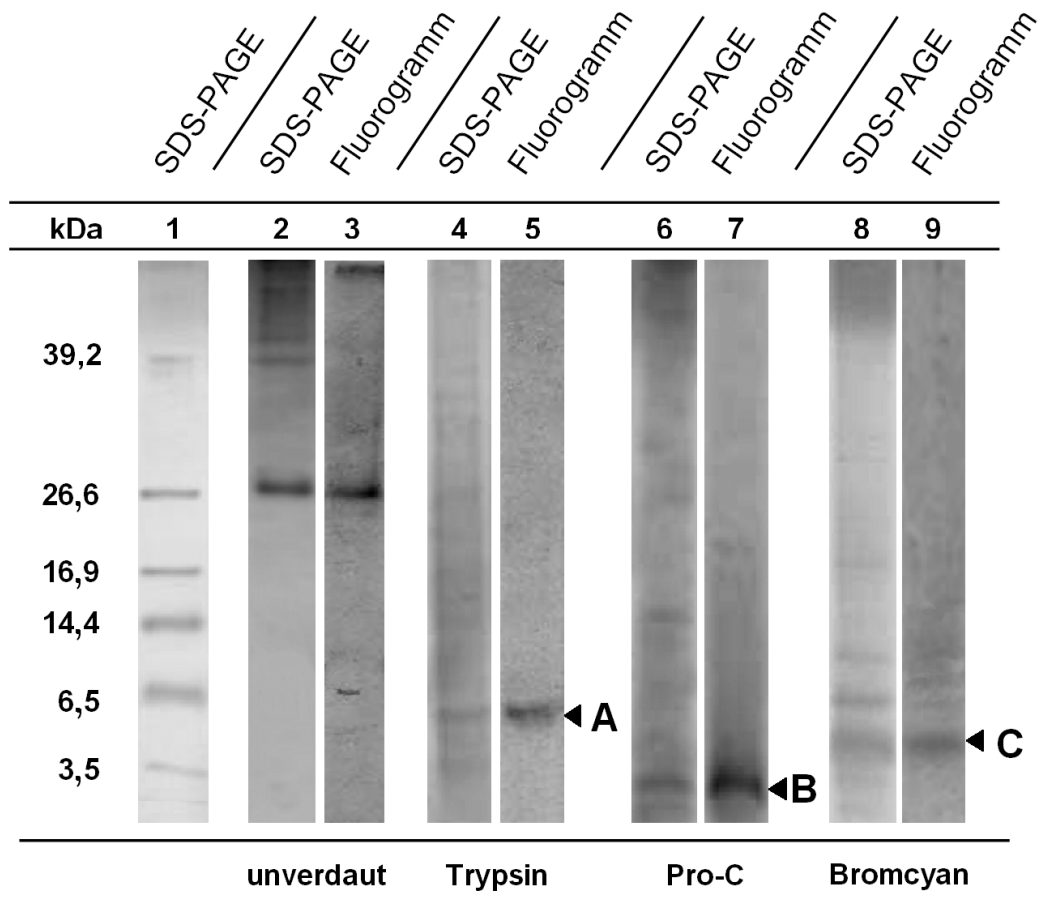
#### 4.1.3 Identifikation der Acetylen-Bindungsstelle

Acetylen ist ein irreversibler Hemmstoff der Ammoniakoxidation von *N. europaea* (Dua et al., 1979; Anderson & Hooper, 1983; Hyman & Wood, 1985; Schmidt et al., 2001a). Acetylen bindet dabei selektiv an die AmoA-Untereinheit der löslichen und membrangebundenen AMO (Hyman & Wood, 1985; Schmidt et al., 2001a; Gilch et al., 2009a). Es wird vermutet, dass die Hemmung als Folge einer versuchten Oxidation der Dreifachbindung des Acetylens erfolgt. Es wird vermutet, dass durch die Öffnung der Dreifachbindung ein reaktives Intermediat entsteht, welches in unmittelbarer Nähe des

katalytischen Zentrums der AMO kovalent an die AmoA-Untereinheit bindet (Hynes & Knowles, 1978; Hyman & Wood, 1985). Da sowohl durch thermische als auch chemische Denaturierung der AMO Acetylen nicht von der AmoA-Untereinheit abgelöst wird (Hyman & Wood, 1985; Gilch et al., 2009a), muss die Bindung des Acetylens kovalent am Protein erfolgen. Eine Bindung an ein Metall (Cu, Fe oder Zn; Tab. 4; Gilch et al., 2009a) kann ausgeschlossen werden, da Metalle durch Denaturierung vom Protein abgelöst werden. Hohe Ammoniakkonzentrationen wirken indes einer raschen Inaktivierung der AMO durch Acetylen entgegen (Hyman & Arp, 1992; Schmidt et al., 2001a). Dieser Sachverhalt zeigt, dass Acetylen zusammen mit Ammoniak um eine Bindung an das aktive Zentrum der AMO konkurriert. Eine genaue Identifizierung der Acetylenbindungsstelle könnte somit gleichzeitig Aufschluss über die Lage des aktiven Zentrums als auch über den von der AMO katalysierten Oxidationsmechanismus liefern.

Um Informationen über den exakten Ort der Acetylenanbindung innerhalb der AmoA-Untereinheit zu erlangen, wurde das gereinigte, mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetylen markierte AmoA-Polypeptid in parallelen Ansätzen jeweils mit Trypsin, Pro-C oder Bromcyan verdaut (Abb. 14; Gilch et al., 2009b). Die daraus resultierenden Proteinfragmente wurden im Anschluss durch Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie auf gebundenes [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetylen hin analysiert. Nach enzymatischen Verdau mit Trypsin und Pro-C sowie durch chemischen Verdau mit Bromcyan konnte ein  $5,6 \pm 1,1$  kDa (A),  $2,6 \pm 0,9$  kDa (B) sowie ein  $4,5 \pm 1,0$  kDa (C) großes [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetylen-markiertes Polypeptid detektiert werden (Abb. 14; Gilch et al., 2009b). Die mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetylen markierten Polypeptide A, B und C wurden anschließend aus dem Gel eluiert und ihre N-terminalen Aminosäuresequenzen mittels Edman-Abbau bestimmt (Gilch et al., 2009b). Auch unmarkierte AMO wurde mittels Trypsin, Pro-C, sowie Bromcyan verdaut und die den radioaktiv markierten Polypeptiden A, B und C entsprechenden unmarkierten Polypeptide wurden ebenfalls aus dem Gel eluiert und N-terminal sequenziert.

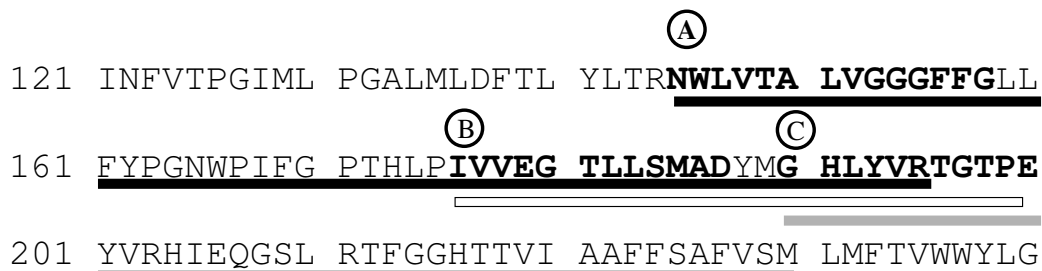




**Abbildung 14:** SDS-PAGE und Fluorogramm von unverdaulichem als auch mit Trypsin, Pro-C und Bromcyan verdaulichem  $^{14}\text{C}$ -markiertem AmoA-Protein (Gilch et al., 2009b). Die aus dem proteolytischen Verdau resultierenden Proteinfragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Tricin-SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung visualisiert (Bahnen 2, 4, 6, 8). Mit  $^{14}\text{C}$ -Acetylen markierte Polypeptide (A, B, C) wurden mittels Fluorographie nachgewiesen (Bahnen 3, 5, 7, 9). Linie 1: molekularer Massenstandard.

Die N-terminalen Sequenzen der mit  $^{14}\text{C}$ -Acetylen markierten und unmarkierten Polypeptide A und B sind dabei identisch. Die N-terminale Aminosäuresequenz des unmarkierten Polypeptids C unterscheidet sich jedoch in einer Aminosäure von der des  $^{14}\text{C}$ -Acetylen markierten Polypeptids. Innerhalb des  $^{14}\text{C}$ -markierten Polypeptids C konnte die Aminosäure an Position 191 nicht eindeutig identifiziert werden. Die Aminosäure an dieser Position besaß im Vergleich zu His 191 des unmarkierten Polypeptids C eine signifikant unterschiedliche Retentionszeit (die Identifikation der Aminosäuren erfolgte mittels HPLC; Gilch et al., 2009b). Die Retentionszeit konnte keiner der natürlich vorkommenden Aminosäuren zugeordnet werden. Demnach kann vermutet werden, dass die Aminosäure an Position 191 des radioaktiv markierten Polypeptids C durch  $^{14}\text{C}$ -Acetylen derivatisiert wurde und deshalb eine veränderte Retentionszeit aufweist.

Nach Identifikation der Polypeptide A, B und C über ihre N-terminale Aminosäuresequenz wurde deren Lokalisierung innerhalb des AmoA-Polypeptids analysiert. Alle drei Polypeptide überlappen dabei in jeweils sechs ihrer Aminosäuren (G<sub>190</sub>HLTVR, Abb. 15, Gilch et al., 2009b). Da jedes der drei Polypeptide radioaktiv markiert ist (Abb. 14), muss sich die Bindungsstelle von [<sup>14</sup>C]-Acetylen folglich innerhalb dieses Hexapeptids befinden.



**Abbildung 15:** Aminosäuresequenz der Polypeptide A, B und C sowie deren Lokalisation innerhalb der Primärsequenz von AmoA (Gilch et al., 2009b). Die Sequenz des radioaktiv markierten Polypeptids A (Verdau mit Trypsin) ist durch einen schwarzen Balken, die Sequenz des radioaktiven Polypeptids B (Verdau mit Pro-C) durch einen schwarz umrandeten weißen Balken und die Sequenz des radioaktiv markierten Polypeptids C (Verdau mit Bromcyan) durch einen grauen Balken hervorgehoben. Die sequenzierten N-terminalen Enden der Polypeptide A, B und C sind durch fett gedruckte Buchstaben hervorgehoben. Die entsprechenden C-terminalen Enden der Polypeptide wurden durch Analyse der charakteristischen Spaltstellen von Trypsin, Pro-C und Bromcyan erhalten. Die Polypeptide überlappen in dem gemeinsamen Hexapeptid G<sub>190</sub>HLTVR.

Durch gleichzeitigen Verdau von <sup>14</sup>C-markierter AmoA mit Trypsin und Bromcyan wurde das durch Acetylen modifizierte Hexapeptid G<sub>190</sub>HLTVR erzeugt und anschließend mittels HPLC gereinigt. Anschließend wurden nach vollständiger Hydrolyse des Hexapeptids die Massen der einzelnen Aminosäuren mittels Massenspektrometrie (MS) bestimmt (Gilch et al., 2009b). Es konnten dabei die Massen von fünf im Hexapeptid G<sub>190</sub>HLTVR vorkommenden Aminosäuren (Glycin, Leucin, Tyrosin, Valin und Arginin) eindeutig bestimmt werden. Die dem Histidin entsprechende Masse von 155,15 Da konnte jedoch nicht identifiziert werden. Stattdessen wurde eine Masse von 197,2 Da detektiert, welche keiner der natürlich vorkommenden Aminosäuren zugeordnet werden konnte. Folglich wird Histidin durch die Anbindung von Acetylen so modifiziert, dass dessen Masse um 42,05 Da zunimmt. Die Modifikation von His 191 durch [<sup>14</sup>C]-Acetylen konnte zudem durch Radioaktivitätsmessungen verifiziert werden. Radioaktivität war hierbei nur in der Aminosäurefraktion

vorhanden, in der sich die derivatisierte Aminosäure mit einer Masse von 197,2 kDa (His 191) befand (Gilch et al., 2009b).

Für das Histidin-Acetylen-Derivat konnten neben einer Masse von 197,2 Da noch weitere Massen von 199,2 Da und 201,2 Da im Verhältnis von 90:7:3 nachgewiesen werden. Da das für die Markierung der AMO verwendete Acetylen hauptsächlich aus nicht radioaktivem Acetylen (92,5 % [ $^{12,12}\text{C}$ ]-Acetylen) und nur zu einem geringen Prozentsatz aus radioaktivem Acetylen (5 % [ $^{12,14}\text{C}$ ]-Acetylen und 2,5 % [ $^{14,14}\text{C}$ ]-Acetylen) bestand, repräsentieren die zusätzlichen Massen von 199,2 und 201,2 Da folglich das durch radioaktives Acetylen ([ $^{12,14}\text{C}$ ]-Acetylen und [ $^{14,14}\text{C}$ ]-Acetylen) derivatisierte Histidin. Allerdings lassen sich die detektierten Massen von 197,2 Da, 199,2 Da und 201,2 Da nicht alleinig durch die Addition der Masse von Histidin (155,15 Da) und [ $^{12,12}\text{C}$ ]-Acetylen (26,04 Da), beziehungsweise Histidin und [ $^{12,14}\text{C}$ ]-Acetylen (28,04 Da) sowie Histidin und [ $^{14,14}\text{C}$ ]-Acetylen (30,04 Da) erklären (Gilch et al., 2009b).

Da Monooxygenasen ihr Substrat oxidieren, indem sie ein Sauerstoffatom in dieses einfügen, könnte dies auch für Acetylen als Substratanalogon zutreffen. Es könnte dabei ein aktiviertes Acetylen-Derivat entstehen, welches daraufhin kovalent an das katalytische Zentrum oder in der unmittelbaren Umgebung des katalytischen Zentrums bindet (im Falle von *N. europaea* an His 191; Gilch et al., 2009b). Fomina et al. (2002) sowie Chan et al. (2004) schlugen hierzu bereits einen Mechanismus für die Inaktivierung der pMMO durch Acetylen vor: Acetylen reagiert im Zuge dieses Mechanismus mit einem Kupferzentrum unter der Bildung eines Ketens ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ; 42,04 Da), welches unmittelbar danach mit einer nukleophilen Spezies nahe des aktiven Zentrums reagiert. Chen & Chan (2006) sowie Chen et al. (2007) postulierten fortführend, dass Histidin einen geeigneten Bindungspartner für die Ketenbindung darstellen könnte. Aufgrund der Isotopenzusammensetzung des verwendeten Acetylens würde die Oxidation von Acetylen durch die lösliche AMO zu Massen von 42,04 Da ([ $^{12,12}\text{C}$ ]-Keten), 44,04 Da ([ $^{14,12}\text{C}$ ]-Keten) und 46,04 Da ([ $^{14,14}\text{C}$ ]-Keten) führen. Eine kovalente Anbindung von [ $^{12,12}\text{C}$ ]-Keten, [ $^{14,12}\text{C}$ ]-Keten und [ $^{14,14}\text{C}$ ]-Keten an His 191 der AmoA-Untereinheit würde dementsprechend zu molekularen Massen von 197,2 Da, 199,2 Da und 201,2 Da für die jeweiligen Histidin-Derivate führen. Diese Massen konnten auch tatsächlich mittels Massenspektrometrie für die Histidin-Derivate ermittelt werden (Gilch et al., 2009b). Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass Acetylen durch Katalyse der AMO aktiviert wird und unter Bildung eines Ketens an His 191 der AmoA-Untereinheit bindet. Die Stöchiometrie zwischen AmoA und Acetylen beziehungsweise Keten liegt folglich bei 1:1. Dieses Ergebnis unterstützt zusammen mit der Beobachtung, dass die

Anbindung von Acetylen an die lösliche AMO mit einer Kupferfreisetzung verbunden ist (Tab. 4; Gilch et al., eingereicht) unsere Vermutung, dass das Motiv Asp 187 - X<sub>3</sub> - His 191 - X<sub>12</sub> - His 204 aus AmoA an der Koordination von ein oder mehreren Kupferatomen beteiligt ist (siehe Abschnitt 4.1.2). Da zudem Acetylen und Ammoniak um die Bindung an das aktive Zentrum der AMO konkurrieren (Hynes & Knowles, 1978; Hyman & Wood, 1985; Schmidt et al., 2001a), kann vermutet werden, dass das Motiv Asp 187 - X<sub>3</sub> - His 191 - X<sub>12</sub> - His 204 zusammen mit dem von ihm koordinierten Kupferatom(en) das katalytische Zentrum der löslichen AMO bildet.

#### 4.1.4 Disproportionierung von Hydroxylamin durch die lösliche AMO

Das Schlüsselenzym AMO katalysiert im Energiestoffwechsel von Ammoniak-oxidierenden Bakterien den ersten Schritt der Oxidation von Ammoniak zu Hydroxylamin (Rees & Nason, 1966; Dua et al., 1979; Hooper et al., 1997; Schmidt & Bock, 1997; Arp et al., 2002). Ungeachtet der Bedeutung dieses Prozesses basiert unser heutiges biochemisches Verständnis der Katalyse lediglich auf Studien mit intakten Zellen, subzellulärer Fraktionen oder auf Vergleichen mit der strukturell und funktionell homologen pMMO der methylotrophen Bakterien (Zahn & DiSpirito, 1996; Hooper et al., 1997; Arp et al., 2002; Arp & Stein, 2003; Schmidt & Jetten, 2004; Lieberman & Rosenzweig, 2005; Balasubramanian & Rosenzweig, 2007; Hakemian et al., 2008; Rosenzweig, 2008). Es sind hauptsächlich zwei Gründe, welche eine strukturelle und biochemische Charakterisierung des Enzyms erschweren beziehungsweise unterbinden: Einerseits verliert die AMO *in vitro* sehr schnell an Aktivität (Suzuki & Kwok, 1970; Suzuki et al., 1981; Ensign et al., 1993; Juliette et al., 1995; Schmidt & Bock, 1998, Gilch et al., 2009a). Der rapide Aktivitätsverlust der AMO in zellfreien Extrakten und subzellulären Fraktionen erschwert somit Studien von Reaktionskinetiken und Katalysemechanismen signifikant. Zum anderen stand bis heute noch keine gereinigte AMO für Aktivitätsmessungen zur Verfügung.

Durch die Entwicklung eines Protokolls zur Reinigung der löslichen AMO stand im Laufe dieser Arbeit das Enzym erstmals direkt für biochemische Untersuchungen zur Verfügung (Gilch et al., 2009a). Leider war es trotz Zugabe aktivitätsstabilisierender Agenzien (100 µM CuCl<sub>2</sub>, 0,2 mM PMSF) nicht möglich, die Ammoniakoxidationsaktivität des Enzyms während der Enzymreinigung aufrecht zu erhalten (Gilch et al., 2009a, Hetzelt et al., eingereicht). Als Ursachen wurden bisher unter anderem das Fehlen des physiologischen

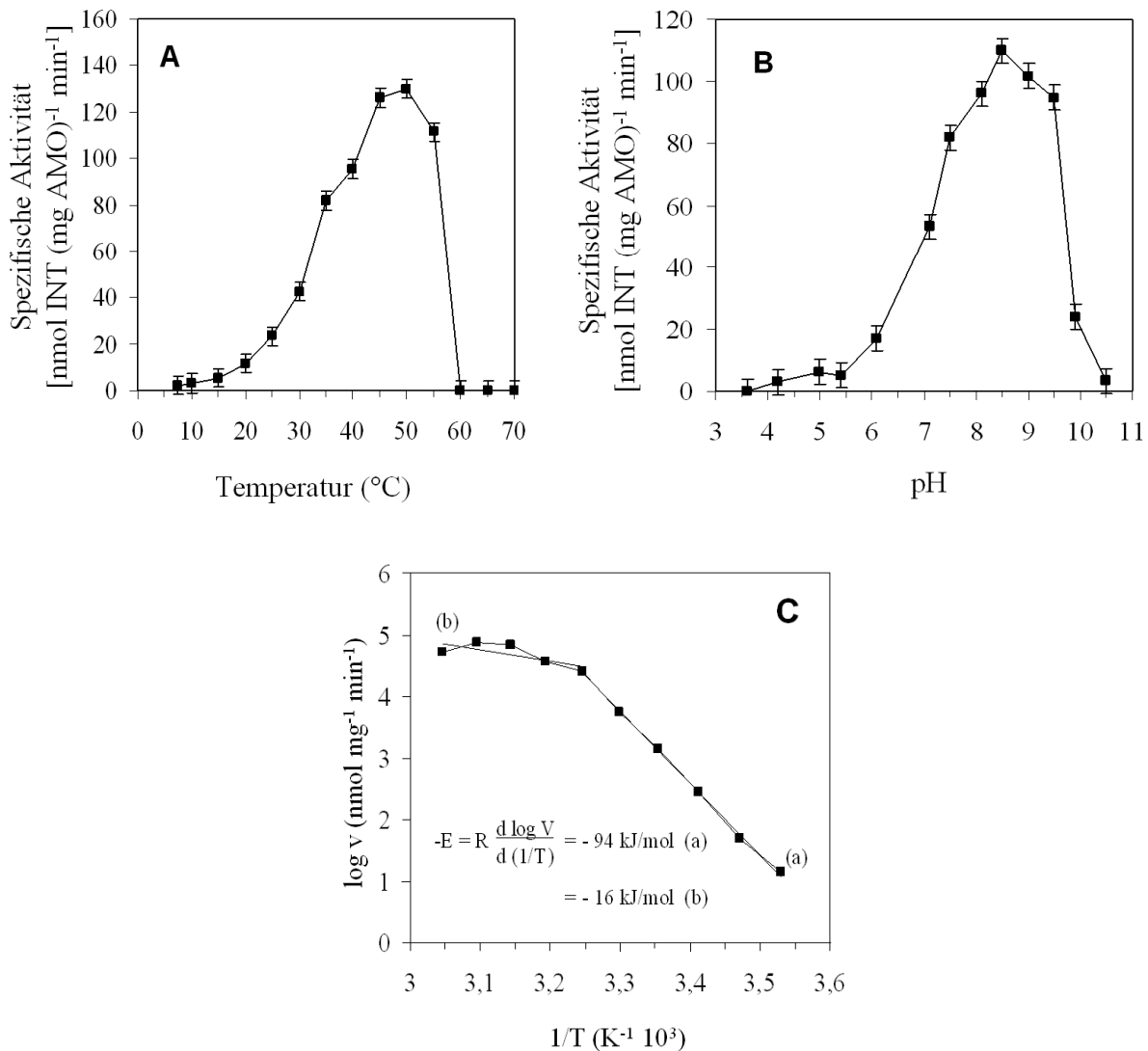
Elektronendonors in zellfreien Extrakten und subzellulären Fraktionen als auch ein durch den Zellaufschluss verursachter Verlust von katalytischen Metallen aufgeführt (Loveless & Painter, 1968; Ensign et al., 1993; Hooper & Terry, 1973; Juliette et al., 1995).

In Analogie zur Alkohol-Dehydrogenase, deren Aktivität und Reaktionskinetik oftmals über die physiologische Rückreaktion (Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol) gemessen wird, wurde die gereinigte lösliche AMO auf die katalytische Umsetzung von Hydroxylamin hin untersucht (Hetzelt et al., eingereicht). Interessanterweise konnte eine zur Menge an löslicher AMO proportionale Umsetzung von Hydroxylamin beobachtet werden. Allerdings katalysiert die lösliche AMO nicht die direkte Rückreaktion der Ammoniakoxidation (Sauerstoff und Ammoniak als Produkt), sondern eine Disproportionierung von Hydroxylamin zu Ammoniak, Nitrat und Nitrit (Hetzelt et al., eingereicht).

Die bei der Disproportionierung freigesetzten Elektronen werden dabei *in vitro* auf Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT;  $E_0 = -90$  mV) übertragen, welches durch die Aufnahme von zwei Elektronen zu Formazan reduziert wird. Des Weiteren konnte als Elektronenakzeptor auch Methylenblau ( $E_0 = +10$  mV) eingesetzt werden. Blue-Tetrazoliumchlorid (BTC;  $E_0 = -160$  mV), NAD ( $E_0 = -320$  mV), Benzylviologen ( $E_0 = -350$  mV) und Methylviologen ( $E_0 = -450$  mV) waren dagegen nicht in der Lage, die bei der Hydroxylamin-disproportionierung anfallenden Elektronen aufzunehmen (Hetzelt et al., eingereicht). Da INT und Methylenblau die beiden höchsten Redoxpotentiale der getesteten Elektronenakzeptoren besitzen, ist es wahrscheinlich, dass die restlichen Elektronenakzeptoren aufgrund ihres im Vergleich zu INT und Methylenblau niedrigeren Redoxpotentials nicht in der Lage waren, Elektronen von der AMO zu übernehmen. Dementsprechend sollte das Redoxpotential der bei der Disproportionierung von Hydroxylamin entstehenden Elektronen zwischen -90 mV (Redoxpotential von INT) und -160 mV (Redoxpotential von BTC) liegen.

Das Temperaturoptimum der Reaktion liegt etwa bei 45 °C und der optimale pH bei etwa 8,5 („optimale Bedingungen“; Abb. 16A,B; Hetzelt et al., eingereicht). Diese Werte unterscheiden sich interessanterweise deutlich vom physiologischen Temperatur- und pH-Optimum von *N. europaea* („physiologische Bedingungen“; 30 °C; pH: 7,5; Wullenweber et al., 1978). Anhand der Arrhenius-Auftragung von Temperatur und Reaktionsgeschwindigkeit wird ein biphasischer Charakter der Hydroxylamindisproportionierung mit einer Übergangstemperatur von etwa 35 °C ersichtlich (Abb. 16C). Die für die Katalyse der Disproportionierung benötigte Aktivierungsenergie beträgt für das Substrat Hydroxylamin dabei 94 kJ mol<sup>-1</sup> bei Temperaturen unterhalb, und 16 kJ mol<sup>-1</sup> bei Temperaturen oberhalb der Übergangstemperatur. Ein biphasischer Verlauf der Arrhenius-Auftragung mit einer

definierten Übergangstemperatur ist dabei charakteristisch für einen zwei- oder mehrstufigen Verlauf einer enzymatischen Reaktion (Londesborough, 1980). Dementsprechend könnte die Disproportionierung von Hydroxylamin durch die lösliche AMO in mindestens zwei Schritten mit einem jeweils unterschiedlichen Temperaturoptimum erfolgen.



**Abbildung 16:** Temperatur- (A) und pH-Abhängigkeit (B) der spezifischen Aktivität der Hydroxylamindisproportionierung durch die lösliche AMO. Die Aktivierungsenergie und die Übergangstemperatur der Reaktion wurde mittels Arrhenius-Auftragung (C) der Daten aus (A) errechnet (Hetzelt et al., eingereicht). Jeder Ansatz enthielt 0,36 mg AMO ml<sup>-1</sup> und 0,5 mM Hydroxylamin. Die spezifischen Aktivitäten wurden anhand der Reduktion von INT zu Formazan ermittelt und repräsentieren jeweils die Mittelwerte aus sechs unabhängig voneinander durchgeführten Messungen ( $\pm$  SD). V: Aktivität in nmol INT (mg AMO)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>; T: Temperatur (K); E: Aktivierungsenergie; R: Gaskonstante.

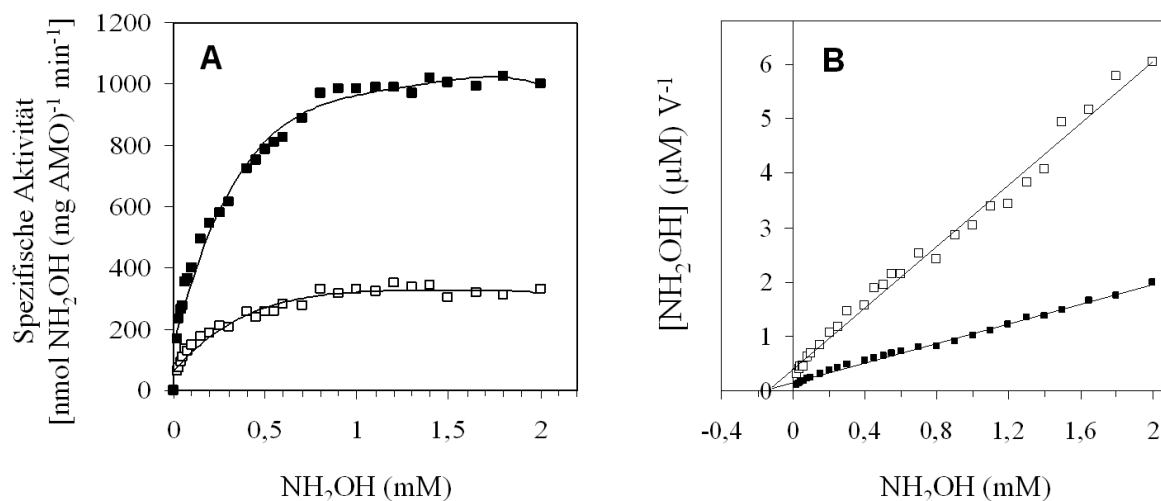
Die spezifische Aktivität der Hydroxylamindisproportionierung ist, im Gegensatz zur Ammoniakoxidation, unabhängig von der Sauerstoffkonzentration (Hetzelt. et al., eingereicht). Dies deutet darauf hin, dass die katalytische Umsetzung von Hydroxylamin durch die lösliche AMO keines Sauerstoffs bedarf. Die Ammoniakoxidationsaktivität von *N. europaea* wird sowohl durch natürliches als auch durch künstliches Licht negativ beeinflusst (Shears & Wood, 1985). Die Umsetzung von Hydroxylamin durch die lösliche AMO ist dagegen sowohl unabhängig von der Wellenlänge als auch der Intensität des einfallenden Lichts (Hetzelt et al., eingereicht). Diese Beobachtung lässt schließen, dass Licht in intakten Zellen nicht direkt auf die AMO sondern schädigend auf andere Zellbestandteile wirkt.

Hydrazin, ein kompetitives Substrat der Hydroxylaminoxidation durch die HAO (Hooper & Nason, 1965; Anderson & Hooper, 1983; Schmidt & Bock 1998; Hendrich et al., 2002), bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Hydroxylaminumsetzung durch lösliche AMO (Hetzelt et al., eingereicht). Dieser Umstand deutet darauf hin, dass Hydrazin als kompetitives Substrat mit Hydroxylamin um die Bindung an das für die Disproportionierung von Hydroxylamin verantwortlich aktive Zentrum der löslichen AMO konkurriert. Im Gegensatz zu Hydrazin zeigte die Zugabe von Acetylen (irreversibler kompetitiver Hemmstoff der AMO; Hynes & Knowles, 1978; Hyman & Wood, 1985) sowie Phenylhydrazin (irreversibler Inhibitor der Hydroxylaminoxidation durch HAO; Logan & Hooper, 1995) keine hemmende Wirkung auf die Aktivität der Hydroxylaminumsetzung (Hetzelt et al., eingereicht). Acetylen bindet in Form eines Ketens kovalent an His 191 der AmoA-Untereinheit der löslichen AMO. Damit diese Bindung an die AmoA-Untereinheit erfolgen kann, bedarf es einer katalytischen Aktivierung (Monooxygenierung) des Acetylens durch Sauerstoff (Schmidt et al., 2001c; Gilch et al., 2009b). Die Disproportionierung von Hydroxylamin stellt jedoch eine Reaktion dar, welche nicht im Stande ist Acetylen durch eine Oxidation zu aktivieren.

*In vivo* konnte die Ammoniakoxidationsaktivität der AMO durch Zugabe von Acetylen vollständig gehemmt werden. Nach Reinigung der Acetylen-gebundenen AMO konnte jedoch die gleiche Aktivität der Hydroxylamindisproportionierung wie bei der ungehemmten gereinigten AMO beobachtet werden (Hetzelt et al., eingereicht). Folglich besitzt die Bindung von Acetylen an die AmoA-Untereinheit der löslichen AMO keinen Einfluss auf die Aktivität der Disproportionierung von Hydroxylamin. Da die Oxidation von Ammoniak im Gegensatz zur Disproportionierung von Hydroxylamin Sauerstoff benötigt, wäre es denkbar, dass Acetylen an das Sauerstoff-koordinierende Zentrum der löslichen AMO bindet. Dieses

Zentrum wird bei der Disproportionierung von Hydroxylamin nicht benötigt und folglich besitzt eine Bindung von Acetylen an dieses Zentrum keine Auswirkungen auf die Aktivität der Sauerstoff-unabhängigen Hydroxylamindisproportionierung. Diese Vermutung wird zudem von der Beobachtung gestützt, dass die anaerobe Ammoniakoxidation von *N. europaea* nicht durch Acetylen gehemmt wird (Schmidt et al., 2001a).

Die spezifische Aktivität der Hydroxylamindisproportionierung durch die lösliche AMO ist nur bei geringen Substratkonzentrationen zu diesen linear proportional. Substratsättigung konnte ab einer Hydroxylaminkonzentration von 1,5 mM beobachtet werden (Abb. 17A). Weiterhin wurde der  $K_m$ -Wert und der  $V_{max}$ -Wert für die Hydroxylamindisproportionierung ermittelt. Hierzu wurden die spezifische Aktivität der Hydroxylamindisproportionierung durch lösliche AMO in Abhängigkeit von der Hydroxylaminkonzentration bei sowohl „optimalen Bedingungen“ als auch bei „physiologischen Bedingungen“ bestimmt (Abb. 17A,B; Hetzelt et al., eingereicht).



**Abbildung 17:** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Hydroxylamindisproportionierung von der Hydroxylaminkonzentration (Hetzelt et al., eingereicht). A: Michaelis-Menten-Darstellung; B: Hanes-Darstellung. Alle Versuche wurden mit 0,36 mg AMO ml<sup>-1</sup> bei pH 8,5 und 45 °C („optimale Bedingungen“) (■) oder bei pH 7,5 und 30 °C („physiologische Bedingungen“) (□) durchgeführt. Die spezifischen Aktivitäten wurden anhand der Reduktion von INT zu Formazan ermittelt und die Werte anhand Gleichung 7 in spezifische Aktivitäten des Hydroxylaminverbrauchs umgerechnet. Die in den Abbildungen aufgeführten Werte repräsentieren jeweils die Mittelwerte aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Messungen (■: SD 8 %; □: SD 11 %).

Unter „optimalen Bedingungen“ wurde ein  $K_m$ -Wert von 155  $\mu$ M und  $V_{max}$ -Wert von 1034 nmol NH<sub>2</sub>OH (mg AMO)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> ermittelt. Unter „physiologischen Bedingungen“ (30 °C und pH 7,5) konnte ein annähernd identischer  $K_m$ -Wert von 142  $\mu$ M bestimmt werden,



jedoch lag der  $V_{\max}$ -Wert mit  $355 \text{ nmol NH}_2\text{OH (mg AMO)}^{-1} \text{ min}^{-1}$  signifikant unter dem maximal möglichen Wert, welcher bei „optimalen Bedingungen“ ( $45^\circ\text{C}$  und  $\text{pH } 8,5$ ) erzielt werden konnte.

Die lösliche AMO katalysiert die Disproportionierung von Hydroxylamin zu Ammoniak, Nitrit und Nitrat. Die freigesetzten Elektronen werden dabei *in vitro* auf INT übertragen. Die unter „optimalen Bedingungen“ ermittelten spezifischen Aktivitäten des Hydroxylaminverbrauchs sowie der Produktion von Ammoniak, Nitrit, Nitrat und Formazan (= reduziertes INT) sind in Tabelle 5 aufgeführt (Hetzelt et al., eingereicht).

**Tabelle 5:** Disproportionierung von Hydroxylamin durch die lösliche AMO (Hetzelt et al., eingereicht). Die spezifischen Aktivitäten des Substratverbrauchs sowie der Produktbildung wurden durch Messung der Hydroxylamin- ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), Ammoniak- ( $\text{NH}_3$ ), Nitrat- ( $\text{NO}_3^-$ ), Nitrit- ( $\text{NO}_2^-$ ) sowie Formazankonzentration bestimmt. Die Versuche wurden bei  $45^\circ\text{C}$ , einem  $\text{pH}$  von  $8,5$  sowie unter Substratsättigung ( $1,5 \text{ mM}$  Hydroxylamin) durchgeführt („optimale Bedingungen“). Die Proteinkonzentration betrug  $0,36 \text{ mg AMO ml}^{-1}$ . Die in der Tabelle aufgeführten Werte repräsentieren den errechneten Mittelwert aus 14 unabhängig durchgeführten Messreihen.

|                            | $\text{NH}_2\text{OH}^a$ | $\text{NH}_3^b$ | $(\text{NO}_3^-)^b$ | $(\text{NO}_2^-)^b$ | Formazan <sup>b</sup> |
|----------------------------|--------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| Aktivität <sup>c</sup>     | $997,8 \pm 48$           | $619,4 \pm 40$  | $260,4 \pm 12$      | $123,9 \pm 5$       | $315,0 \pm 7$         |
| Stöchiometrie <sup>d</sup> | 3,2                      | 2,0             | 0,8                 | 0,4                 | 1                     |

<sup>a</sup> Substanz verbraucht

<sup>b</sup> Substanz produziert

<sup>c</sup> Spezifische Aktivität in  $[\text{nmol (mg AMO)}^{-1} \text{ min}^{-1}]$

<sup>d</sup> Die Formazanproduktion wurde auf 1 gesetzt.

Ausgehend von den spezifischen Aktivitäten des Hydroxylaminverbrauchs sowie der Produktion von Ammoniak, Nitrit, Nitrat und Formazan (Tab. 5) kann die von der löslichen AMO katalysierte Disproportionierung von Hydroxylamin durch folgende Gleichung beschrieben werden (Gleichung 7; Hetzelt et al., eingereicht):



Die Aktivität des Hydroxylaminverbrauchs war direkt proportional zur Menge an löslicher AMO. Eine chemische Disproportionierung von Hydroxylamin kann aus zwei Gründen

ausgeschlossen werden: Zum einen war in Ansätzen ohne AMO unter „optimalen“ als auch „physiologischen Bedingungen“ kein Verbrauch von Hydroxylamin beziehungsweise keine Produktion von Ammoniak, Nitrit, Nitrat und Formazan zu beobachten. Zum anderen würde eine chemische Disproportionierung von Hydroxylamin nicht zur Produktion von  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  und  $[\text{H}]$ , sondern zur Entstehung von  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  und  $\text{NO}^+$  führen (Alluisetti et al., 2004).

Für zellfreie Extrakte von *N. europaea* wurden Ammoniakoxidationsaktivitäten von bis zu  $80 \text{ nmol O}_2 (\text{mg Protein})^{-1} \text{ min}^{-1}$  berichtet, was auf das Substrat  $\text{NH}_3$  berechnet eine maximale Aktivität von  $50 \text{ nmol NH}_3 (\text{mg Protein})^{-1} \text{ min}^{-1}$  bedeutet (Suzuki & Kwok, 1970; Ensign et al., 1993; Juliette et al., 1995; Schmidt & Bock, 1998; Gilch et al., 2009a). Da die AMO in etwa 12 % des Gesamtproteins von *N. europaea* entspricht (Gilch et al., 2009a), lässt sich eine spezifische Ammoniakoxidationsaktivität von ungefähr  $420 \text{ nmol NH}_3 (\text{mg AMO})^{-1} \text{ min}^{-1}$  berechnen. Die spezifische AMO-Aktivität liegt somit in der gleichen Größenordnung wie die unter „physiologischen Bedingungen“ bestimmte Aktivität der von der AMO katalysierten Hydroxylamin-disproportionierung [ $355 \text{ nmol NH}_2\text{OH} (\text{mg AMO})^{-1} \text{ min}^{-1}$ ]. Unter „optimalen Bedingungen“ übersteigt die Aktivität der Hydroxylamin-disproportionierung [ $1034 \text{ nmol NH}_2\text{OH} (\text{mg AMO})^{-1} \text{ min}^{-1}$ ] sogar deutlich die spezifische Ammoniakoxidationsaktivität im zellfreien Extrakt. Die Affinität der AMO für das Substrat Ammoniak ist mit einem  $K_m$ -Wert von ungefähr  $20 \mu\text{M}$  (Grönweg et al., 1994; Schmidt & Bock, 1998) deutlich höher als für das Substrat Hydroxylamin ( $K_m \sim 140 \mu\text{M}$ , Abb. 17; Hetzelt et al., eingereicht).

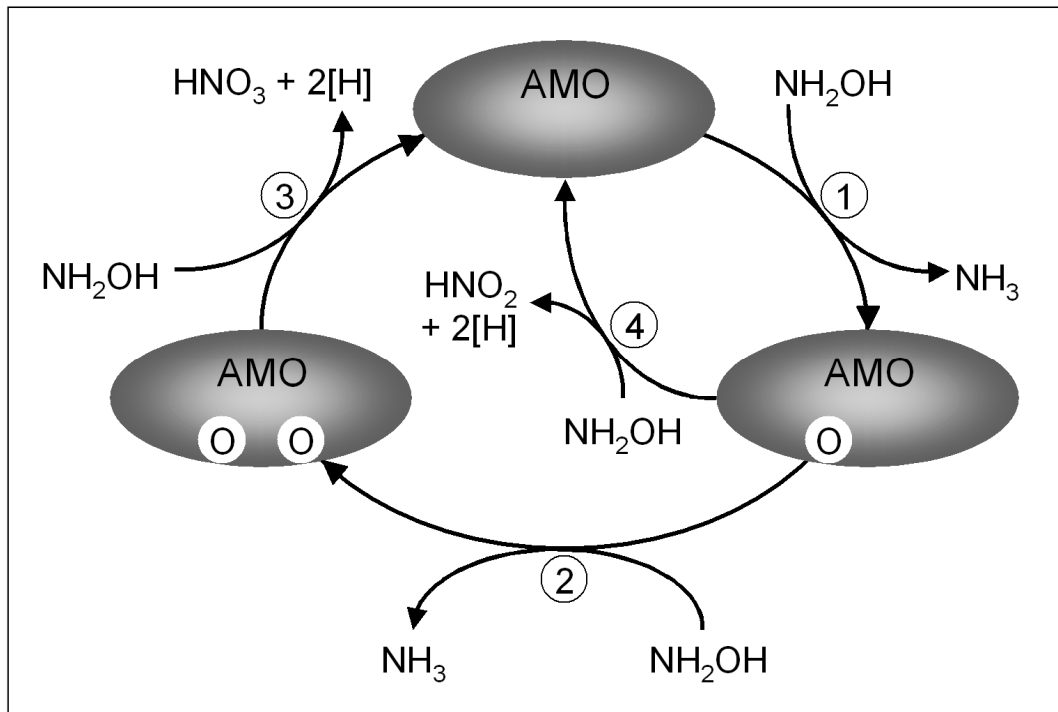
Die lösliche AMO katalysiert *in vitro* die Umsetzung von Hydroxylamin zu Ammoniak, Nitrat und Nitrit (Tab. 5, Gleichung 7, Hetzelt et al., eingereicht). Es war jedoch fraglich ob eine Disproportionierung von Hydroxylamin auch *in vivo* erfolgt. Um Aufschluss über eine eventuelle alternative Funktion der AMO *in vivo* zu erhalten, wurden aktiv Ammoniak-oxidierende *Nitrosomonas*-Zellen verschiedenen Hydroxylaminkonzentrationen ausgesetzt (0 - 1 mM). Tatsächlich konnte in intakten Zellen eine von der Hydroxylaminkonzentration abhängige Nitratproduktion beobachtet werden (Hetzelt et al., eingereicht). Da *N. europaea* neben der Disproportionierung von Hydroxylamin keine weiteren Stoffwechselwege zur Produktion von Nitrat besitzt (Chain et al., 2003), ist die Menge an freigesetztem Nitrat ein quantitativer Maßstab für die von der AMO katalysierten Disproportionierung von Hydroxylamin. Eine signifikante Nitratproduktion konnte auch nach Zugabe von Hydrazin (kompetitiver reversibler Hemmstoff der HAO; Hooper & Nason, 1965; Anderson & Hooper, 1983; Schmidt & Bock 1998; Hendrich et al., 2002) und Phenylhydrazin (kompetitiver

irreversibler Hemmstoff der HAO; Logan & Hooper, 1995) beobachtet werden. Beide Stoffe hemmen die Oxidation von Hydroxylamin durch die HAO. Dies hat demnach einen Anstieg der Hydroxylaminkonzentration zur Folge. Als Konsequenz der erhöhten endogenen Hydroxylaminkonzentration, steigt die Hydroxylamindisproportionierungsaktivität der AMO und somit die Nitratproduktion (Hetzelt et al., eingereicht).

Neben den Produkten Ammoniak, Nitrit und Nitrat entstehen bei der Disproportionierung von Hydroxylamin auch Reduktionsäquivalente ( $0,75 \text{ mol [H]}$  pro mol  $\text{NH}_2\text{OH}$ ; Tab. 5; Gleichung 7; Hetzelt et al., eingereicht). Im Gegensatz zur Ammoniakoxidation ( $2 \text{ mol [H]}$  pro mol  $\text{NH}_3$ , Hooper & Terry, 1979; Anderson & Hooper, 1983; DiSpirito et al., 1985; Arp et al., 2002) ist die Effizienz allerdings deutlich geringer, und bisher konnte auch noch kein Wachstum mit Hydroxylamin als energielieferndem Substrat beobachtet werden (Boettcher & Koops, 1994; de Bruijn et al., 1997). Hydroxylamin stellt ein Intermediat dar, welches im Laufe der Nitrifikation gebildet wird. Unausgeglichene Enzymaktivitäten, welche zum Beispiel durch die physikalische Separation der an der Ammoniakoxidation beteiligten Enzyme (AMO cytoplasmatisch, Gilch et al., 2009a; HAO periplasmatisch, Olson & Hooper, 1983; DiSpirito et al., 1985; Hooper et al., 1984; Hoppert et al., 1995) begünstigt werden können, könnten zu einer Überproduktion und folglich zu einer intrazellulären Anhäufung von Hydroxylamin führen (Zart, 1997). Die Disproportionierung von Hydroxylamin durch die AMO würde daher einen eleganten Weg darstellen, einer möglichen Akkumulation des in höheren Konzentrationen toxischen Hydroxylamins (signifikante Verlangsamung des Zellwachstums ab  $\sim 100 \text{ }\mu\text{M}$  Hydroxylamin; Zart, 1997) entgegen zu wirken. *N. europaea* würde bei der Detoxifizierung von Hydroxylamin durch die AMO zudem größtenteils ihr energielieferndes Substrat Ammoniak zurückgewinnen, welches zu einem späteren Zeitpunkt wieder unter Energiegewinn oxidiert werden könnte. Die Annahme einer Beteiligung der AMO an der Detoxifizierung von Hydroxylamin wird zusätzlich durch die Beobachtung gestärkt, dass der  $K_m$ -Wert der AMO für Hydroxylamin ( $\sim 140 \text{ }\mu\text{M}$ ) in etwa dem Wert entspricht, ab dem Hydroxylamin inhibierend auf das Wachstum von *N. europaea* wirkt ( $\sim 100 \text{ }\mu\text{M}$ ; Zart, 1997).

Der biphasische Verlauf der Arrhenius-Auftragung deutet auf einen zwei- oder mehrstufigen Verlauf der Hydroxylamindisproportionierung hin (Abb. 16C; Londesborough, 1980; Hetzelt et al., eingereicht). Basierend auf der Reaktionsstöchiometrie der löslichen AMO (Tab. 5; Gleichung 7) sowie der Reaktionsstöchiometrie und dem Reaktionsmechanismus der strukturell und enzymatisch gut untersuchten Katalase (Chelikani et al.,

2004) kann deshalb ein zwei- beziehungsweise dreistufiger Reaktionsmechanismus für die AMO-katalysierte Disproportionierung von Hydroxylamin vorgeschlagen werden (Abb. 18).



**Abbildung 18:** Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Disproportionierung von Hydroxylamin durch die lösliche AMO (Hetzelt et al., eingereicht). Reaktionen 1 bis 3 repräsentieren einen dreistufigen, die Reaktionen 1 und 4 einen zweistufigen Reaktionszyklus. Reduktionsäquivalente ( $[\text{H}]$ ) werden auf INT übertragen.

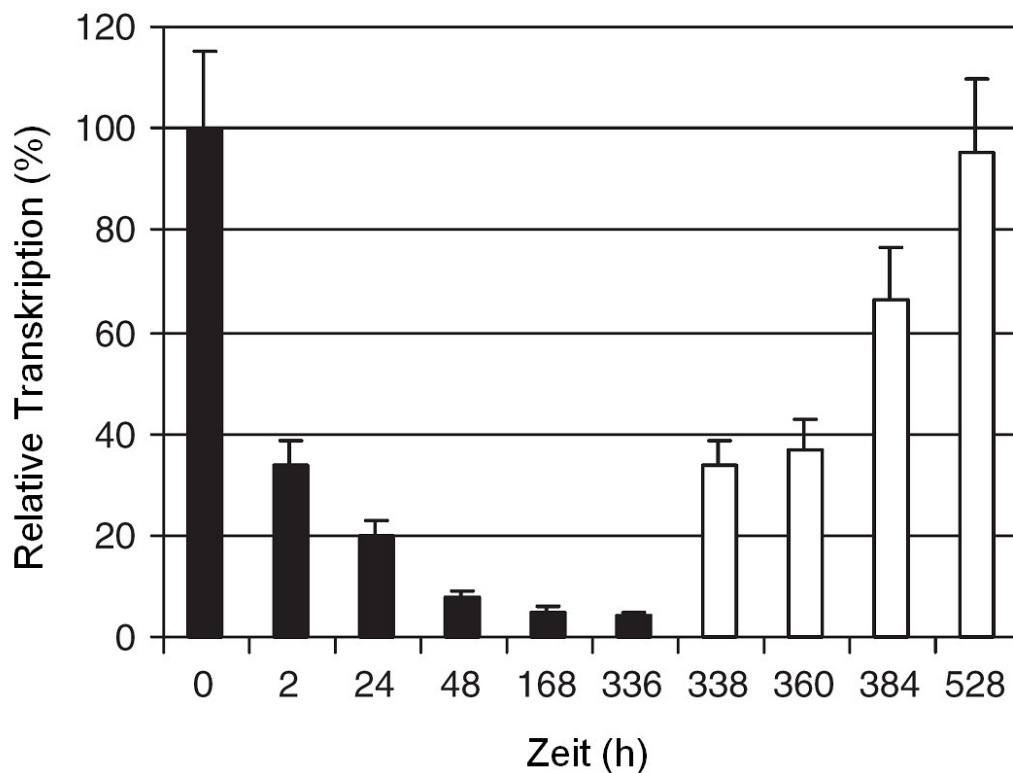
Durch sequentielle Katalyse der Reaktionen 1 bis 3 setzt die lösliche AMO drei Moleküle Hydroxylamin zu zwei Molekülen Ammoniak und einem Nitratmolekül um. Dabei werden im letzten Schritt (Schritt 3) zwei Reduktionsäquivalente freigesetzt, welche *in vitro* auf INT übertragen werden. Die sequentielle Katalyse der Reaktionen 1 und 4 produziert dagegen aus zwei Molekülen Hydroxylamin ein Ammoniakmolekül, ein Nitritmolekül und ebenfalls zwei Reduktionsäquivalente. Eine Kombination des zweistufigen (Reaktionen 1 bis 3) und dreistufigen (Reaktionen 1 und 4) Reaktionszyklus führt dementsprechend zu einer Disproportionierung von Hydroxylamin zu Ammoniak, Nitrit und Nitrat. In allen von uns durchgeführten Versuchen konnte eine fixe Stöchiometrie der aus der Disproportionierung von Hydroxylamin gebildeten Produkte beobachtet werden (Gleichung 7; Tab. 5; Hetzelt et al., eingereicht). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass durch Veränderung der Reaktionsbedingungen eine von Tabelle 5 beziehungsweise Gleichung 7 abweichende Stöchiometrie der gebildeten Produkte Ammoniak, Nitrit und Nitrat erhalten werden kann.

#### 4.2 Aufnahme und Akkumulation des Substrates Ammoniak durch *N. europaea*

*N. europaea* besitzt eine katalytisch aktive, cytoplasmatische AMO (Tab. 1 und 2; Abb. 7 und 8; Gilch et al., 2009a). Da die lösliche AMO ungefähr in gleicher Menge vorliegt wie die membrangebundene AMO (Tab. 2) und zudem beide Formen eine ähnliche spezifische Aktivität aufweisen (Tab. 1), kann angenommen werden, dass die lösliche Form der AMO maßgeblich an der Ammoniakoxidation und damit an der Energiegewinnung von *N. europaea* beteiligt ist. Gleichermäßen ist anzunehmen, dass auch die membrangebundene AMO ihr Substrat Ammoniak im Cytoplasma oxidiert, da der pH im Periplasma ( $\text{pH} < 6$ ; Weidinger et al., 2007) zu gering ist, um Ammoniakoxidation durch die AMO zu ermöglichen (Suzuki et al., 1974; Schmidt et al., 1998). Der pH im Cytoplasma ( $\text{pH} 7\text{--}8$ ; Kumar & Nicholas, 1983) entspricht dagegen dem pH-Optimum der Ammoniakoxidation durch die AMO (Suzuki et al., 1974; Schmidt et al., 1998). Da bei der Oxidation von Ammoniak zu Nitrit effektiv nur zwei Reduktionsäquivalente pro  $\text{NH}_3$ -Molekül anfallen (bei der vollständigen Oxidation von Glukose fallen im Vergleich 12 Reduktionsäquivalente an), muss *N. europaea* eine große Anzahl von Ammoniakmolekülen zu Nitrit oxidieren, um genügend Energie für bioenergetische Zwecke zu gewinnen. Eine passive Diffusion des membrangängigen Ammoniaks in das Cytoplasma (Kleiner, 1981) reicht allerdings nicht aus, um die hohen Ammoniakoxidationsaktivitäten von *N. europaea* zu erklären (Keen & Prosser, 1987; Zart & Bock, 1998; Chapman et al., 2006; Beyer et al., 2009; Güven & Schmidt, 2009). Dies gilt insbesondere für *Nitrosomonas*-Populationen an ihren natürlichen Habitaten, da dort die frei verfügbare Konzentration an  $\text{NH}_3$  (an den meisten Orten unter  $1\text{ }\mu\text{M}$  bei  $\text{pH} 7$ ; Stein et al., 2007; Bollmann et al., 2002) nicht ausreichen würde, um den Energiebedarf der Ammoniakoxidanten zu decken. Überdies wurden signifikante Ammoniakoxidationsaktivitäten bei Stämmen entdeckt, welche in Habitaten mit niedrigem pH ( $\text{pH} < 6$ ; Burton & Prosser, 2001; de Boer & Kowalchuk, 2001; Tarre & Green, 2004) und damit weitaus geringeren  $\text{NH}_3$ -Konzentrationen [ $\text{pK}_a(\text{NH}_3) = 9,25$ ] vorzufinden sind. Basierend auf diesen Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, dass *N. europaea* eines Ammoniaktransporters bedarf, um eine ausreichende hohe Aufnahme an  $\text{NH}_3$  zu ermöglichen.

Das Genom von *N. europaea* enthält in einer einzelnen Kopie das Gen (*rhl*), welches ein Transportprotein vom Rhesus-Typ kodiert. Rhesus-Gene kommen hauptsächlich in den Genomen von Archaeen, Pilzen, Pflanzen und Tieren vor und sind hingegen sehr selten in Bakterien zu finden (Chain et al., 2003; Huang & Peng, 2005; Cherif-Zahar et al., 2007). Da Proteine des Rhesus-Typs in eukaryotischen Systemen für einen bidirektionalen Transport

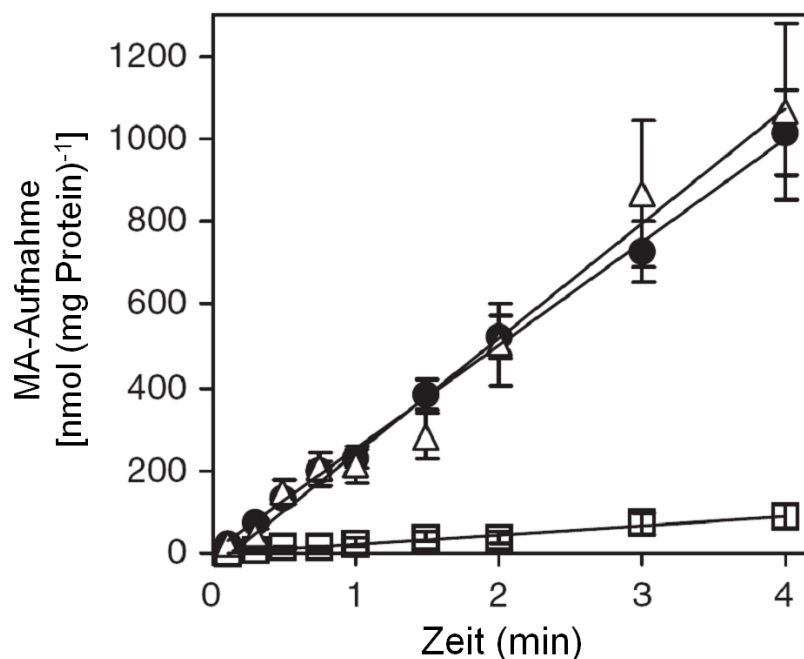
von Ammoniak verantwortlich sind (Marini et al., 2000; Westhoff et al., 2002; Ludewig, 2004; Mak et al., 2006; Mayer et al., 2006) liegt es nahe, dass das *rhl*-Gen in aktiv Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen transkribiert wird und dessen Genprodukt eine Funktion beim Transport von Ammoniak besitzt. Die Transkription von *rhl* bei „nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen“ und bei „denitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen“ (Definition siehe Abb. 19) wurde nachgewiesen, indem die Konzentration an *rhl*-nRNA unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen bestimmt wurde. Hierzu wurden *Nitrosomonas*-Kulturen unter oxischen Bedingungen angezogen, nachfolgend für 336 Stunden unter anoxischen Bedingungen inkubiert und daraufhin wiederum oxischen Bedingungen ausgesetzt. Zu den in Abb. 19 ersichtlichen Zeiten wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Menge an *rhl*-mRNA per „Slot-Blot“ bestimmt (Abb. 19; Weidinger et al., 2007).



**Abbildung 19:** Relative Transkription von *rhl* bei „nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen“ (oxische Bedingungen, chemolithotrophe Ammoniakoxidation; Ammoniak als energielieferndes Substrat) und „denitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen“ (anoxische Bedingungen, heterotrophe Denitrifikation, Pyruvat als energielieferndes Substrat) (Weidinger et al., 2007). Alle Signale wurden bezüglich des höchsten Werts ( $t = 0$  h) normiert. Das Experiment wurde mit aerob gewachsenen Bakterien gestartet, welche zum Zeitpunkt  $t = 0$  h anoxischen Bedingungen ausgesetzt wurden (0-336 h; schwarze Balken). Anschließend wurden die Bakterien erneut in oxische Bedingungen überführt (338-528 h; weiße Balken). Die angegebenen Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Messungen ( $\pm$  SD).

Die Ergebnisse zeigen, dass „nitrifizierende *Nitrosomonas*-Zellen“ das *rhl*-Gen im signifikanten Maße transkribieren. Die Transkription des *rhl*-Gens wird dagegen bei „denitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen“ um bis zu 95 % gegenüber der maximalen Transkription bei nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Kulturen“ reduziert. Eine Erhöhung beziehungsweise Verminderung der Ammoniumkonzentration im Medium der „nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen“ bewirkte indes keine bedeutsame Veränderung der Transkriptionsintensität (Weidinger et al., 2007).

Um die Auswirkungen der unterschiedlicher *rhl*-Transkriptionsintensitäten auf die Ammoniakaufnahmeaktivität zu untersuchen, wurden mittels [ $^{14}$ C]-Methylammonium (MA) die Transportaktivitäten von „nitrifizierenden“ und „denitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen“ bestimmt (Abb. 20; Weidinger et al., 2007).

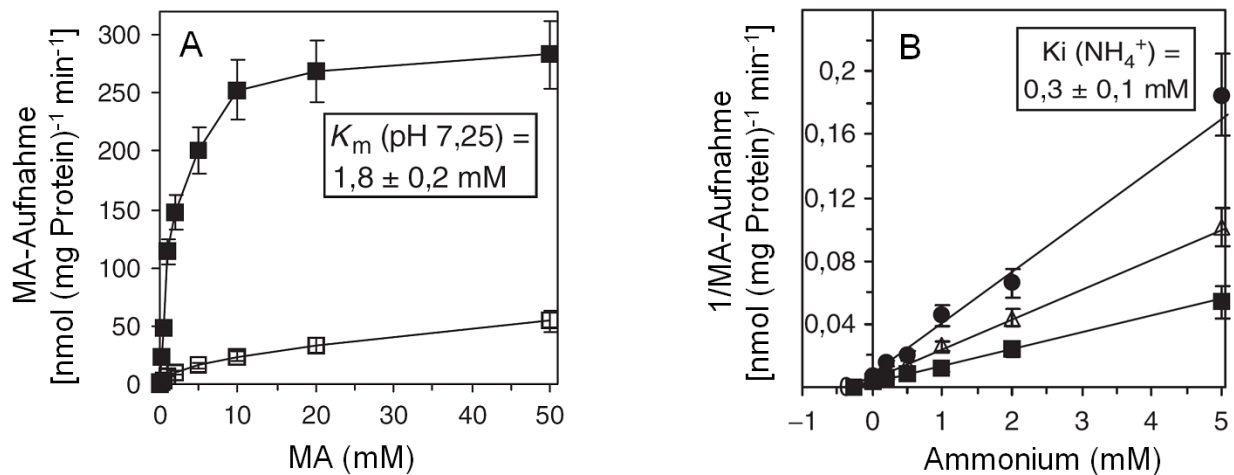


**Abbildung 20:** Methylammonium (MA)-Aufnahme von *N. europaea* (Weidinger et al., 2007). Die MA-Konzentration wurde auf 10 mM und die Zelldichte auf  $5 \times 10^9$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  [entspricht  $0,8 \text{ (mg Protein)} \text{ ml}^{-1}$ ] eingestellt. Die MA-Aufnahme wurde anhand von [ $^{14}$ C]-MA bei „nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen“ (●), „nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen“ unter Zusatz von 20  $\mu\text{M}$  L-Methioninsulfon (MSF) (Δ) sowie bei „denitrifizierende *Nitrosomonas*-Zellen“ (□) gemessen. Die angegebenen Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Messungen ( $\pm$  SD).

Die MA-Aufnahmeaktivität von „denitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen“ liegt mit  $23,3 \pm 2,2$  nmol MA (mg Protein)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> ungefähr um das zehnfache niedriger als die MA-Aufnahmeaktivitäten von „nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen“ [ $252,7 \pm 50,9$  nmol MA (mg Protein)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>]. „Denitrifizierende *Nitrosomonas*-Zellen“ haben im Vergleich zu „nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen“ einen erheblich geringeren Ammoniakbedarf, da sie Stickstoff nur als Baustoff für die Assimilation hochmolekularer Verbindungen und nicht als Substrat für die Energiegewinnung benötigen. Die Ergebnisse zeigen somit, dass sowohl die Transkription von *rh1* als auch die Aktivität der MA-Aufnahme mit dem Ammoniakbedarf der Bakterien korreliert. Die Zugabe verschiedener Konzentrationen des Glutaminsynthetase-Inhibitors L-Methioninsulfon (0 – 20 µM MSF) beeinflusste die MA-Aufnahmeaktivitäten nicht (Abb. 20; Weidinger et al., 2007). Die Glutaminsynthetase ist in *Escherichia coli* für den Einbau von Ammonium in organisches Zellmaterial verantwortlich, und es konnte gezeigt werden, dass mit einer Hemmung der Glutaminsynthetase mit MSF auch die MA-Aufnahme zum Erliegen kam (Javelle et al., 2005). Die Resultate aus Abb. 20 lassen somit erkennen, dass bei *N. europaea* die Assimilation von Ammonium nicht mit dem Ammoniaktransport gekoppelt ist.

Für die Aufnahme von MA durch den Rhesus-Transporter konnte bei pH 7,25 ein K<sub>m</sub>-Wert von  $1,8 \pm 0,2$  mM ermittelt werden (Abb. 21A, Weidinger et al., 2007). Der K<sub>m</sub>-Wert des Rhesus-Transporters von *N. europaea* liegt somit im Bereich der eukaryotischen Rhesus-Transporter (Marini et al., 2000; Ludewig, 2004). Zahlreiche Studien an Transportern des Rhesus-Typs deuten darauf hin, dass der ungeladene Ammoniak und nicht das geladene Ammonium-Kation transportiert wird (Marini et al., 2000; Westhoff et al., 2002; Ludewig, 2004; Mak et al., 2006; Mayer et al., 2006). In *N. europaea* bleibt der errechnete K<sub>m</sub>-Wert bezüglich der ungeladenen Form von MA bei verschiedenen pH-Werten (6,75 - 8,25) nahezu konstant bei 1 µM, was vermuten lässt, dass in *N. europaea* ebenfalls die ungeladene Form von MA transportiert wird. Diese Annahme wird durch Messung der pH-abhängigen MA-Aufnahmeaktivität von *Nitrosomonas*-Kulturen bekräftigt. Die beobachtete MA-Aufnahmeaktivität steigt nahezu exponentiell mit dem pH-Wert an (Weidinger et al., 2007). Die maximale Kapazität der Rh1-abhängigen MA-Aufnahme wird bei etwa 20 mM MA erreicht (pH 7,25). Eine weitere Erhöhung der MA-Konzentration hatte keine signifikant gesteigerte MA-Aufnahmeaktivität zur Folge.

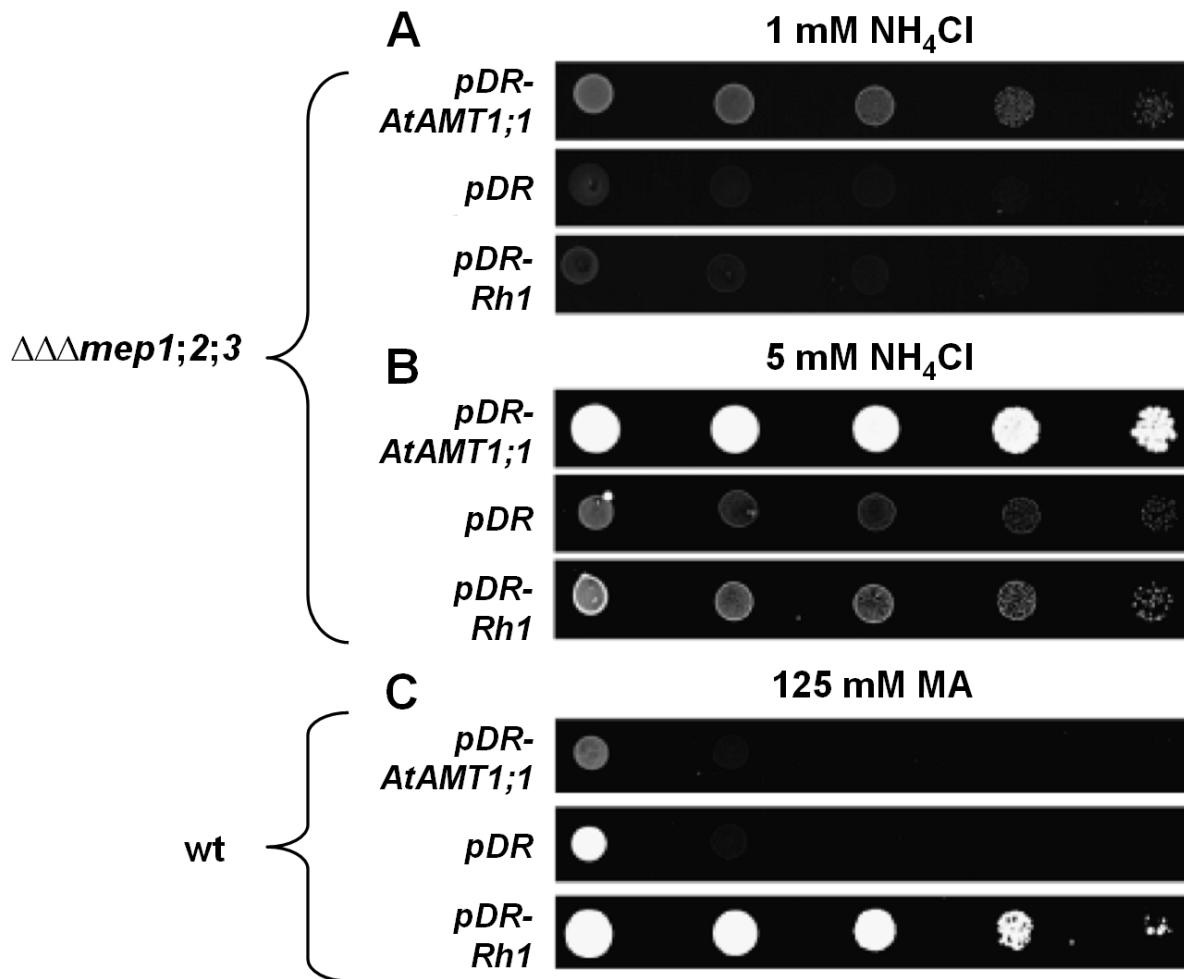




**Abbildung 21:** Aufnahmekinetik von MA in *N. europaea* (Weidinger et al., 2007). A: Korrelation zwischen MA-Aufnahme und MA-Konzentration bei pH 7,25. (■) „Nitrifizierende *Nitrosomonas*-Zellen“; Der  $K_m$ -Wert für MA war vom pH abhängig:  $K_m(\text{pH } 6,75) = 5,2 \pm 0,9$  mM;  $K_m(\text{pH } 7,75) = 0,61 \pm 0,3$  mM;  $K_m(\text{pH } 8,25) = 0,19 \pm 0,08$  mM. Der  $K_m$ -Wert war jedoch unabhängig vom pH bei 1  $\mu\text{M}$  wenn er für die ungeladene Form von MA berechnet wurde. (□) „denitrifizierende *Nitrosomonas*-Zellen. B: Hemmung der MA-Aufnahme durch Ammonium bei pH 7,25. (■) 10 mM MA; (Δ) 5 mM MA; (●) 1 mM MA. Alle angegebenen Werte repräsentieren den Mittelwert aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Messungen ( $\pm$  SD).

Die Aufnahme von MA durch den Rh1-Transporter wird kompetitiv durch Ammoniak gehemmt. Durch Aktivitätsmessungen in Gegenwart von verschiedenen Ammoniakkonzentrationen konnte ein  $K_i$ -Wert von  $0,3 \pm 0,1$  mM bestimmt werden (Abb. 21B; Weidinger et al., 2007). Die Beobachtung, dass durch Zugabe von Ammonium die MA-Aufnahme kompetitiv gehemmt wird, deutet darauf hin, dass beide Substanzen von einem gemeinsamen Transportprotein (Rh1), transportiert werden. Ein passiver Transport beider Substanzen über die Cytoplasmamembran würde naturgemäß zu keiner gegenseitigen Beeinflussung der Aufnahmeaktivitäten von Ammoniak und MA führen.

Um die Funktion des Rh1-Transporters als Ammoniaktransporter in *N. europaea* zu verifizieren, wurde das *rh1*-Gen in eine dreifach *mep*-defiziente *Saccharomyces cerevisiae*-Mutante (31019b;  $\Delta\Delta\Delta mep1;2;3$ ) kloniert und darin exprimiert (*mep*-Gene kodieren in *S. cerevisiae* für Methylammonium- und Ammonium-Permeasen). Sowohl zur Kontrolle als auch zum Vergleich wurde der aktive Ammoniumtransporter AtAMT1;1 aus *Arabidopsis thaliana* ebenfalls in die dreifach *mep*-defiziente *S. cerevisiae*-Mutante kloniert und exprimiert (Mayer & Ludewig, 2006). Die Wachstumsraten der *S. cerevisiae*-Stämme zeigen deutlich, dass das Rh1-Protein von *N. europaea* in der Lage ist, die Ammoniakaufnahme in *S. cerevisiae* zu unterstützen (Abb. 22; Weidinger et al., 2007).

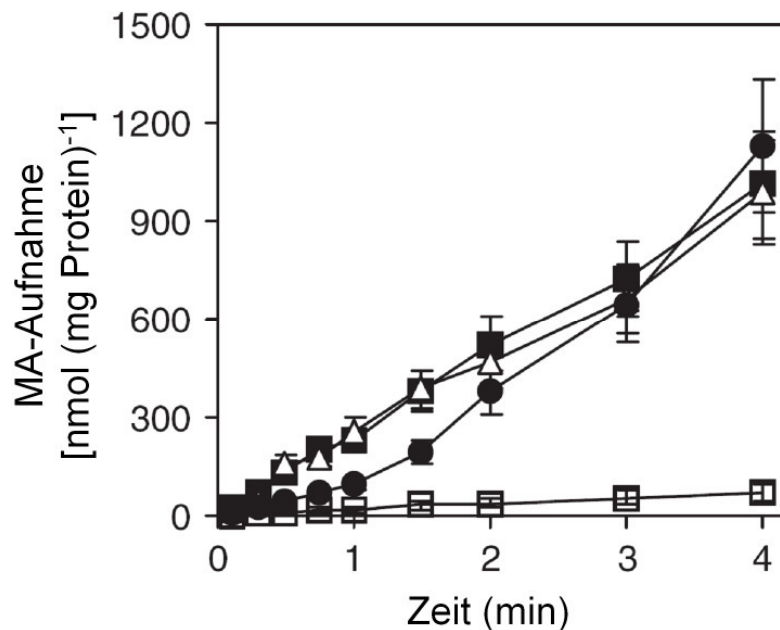


**Abbildung 22:** Wachstum von *mep*-defizienten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen mit exprimiertem Rh1-Protein aus *Nitrosomonas europaea* und dem AtAMT1;1 Ammoniumtransporter aus *Arabidopsis thaliana* (Weidinger et al., 2007). Von links nach rechts sind jeweils 10-fache Verdünnungen der jeweiligen *S. cerevisiae*-Kultur aufgetragen. A, B: Wachstum eines Ammoniumtransporter-defizienten *S. cerevisiae*-Stammes (31019b;  $\Delta\Delta\Delta mep1;2;3$ ) mit transformiertem AtAMT1;1 (pDR-ArAMT1;1), leerem pDR-Plasmid (pDR), oder transformiertem Rh1 (pDR-Rh1). Dem YNB-Nährmedium (pH 5,5) wurden jeweils 1 mM (A) oder 5 mM NH<sub>4</sub>Cl (B) zugesetzt. C: Wachstum eines Wildtyp *S. cerevisiae*-Stammes mit transformiertem AtAMT1;1 (pDR-ArAMT1;1), leerem pDR-Plasmid (pDR), oder transformiertem Rh1 (pDR-Rh1). Dem YNB-Nährmedium (pH 5,5) wurde 125 mM MA zugesetzt.

Die Expression von Rh1 verbesserte bei einer Ammoniumkonzentration von 5 mM das Wachstum des Ammoniumtransporter-defizienten *S. cerevisiae*-Stammes signifikant, wenngleich das Wachstum des mit AtAMT1;1-transformierten Stammes deutlich besser war (Abb. 22B). Die Expression von Rh1 im Wildtyp *S. cerevisiae*-Stamm verlieh diesem eine Resistenz gegen das toxische MA (Abb. 22C). Im Gegensatz zu den Methylammonium- und Ammonium-Permeasen von *S. cerevisiae* sind Rhesus-Proteine aufgrund der bidirektionalen

Transportercharakteristik (Marini et al., 2000; Westhoff et al., 2002; Ludewig, 2004; Mak et al., 2006; Mayer et al., 2006) in der Lage, MA auch wieder aus dem Zellinneren hinaus zu transportieren und so die MA-Konzentration in den Zellen niedrig zu halten. Demnach schützt Rh1 *S. cerevisiae* vor hohen toxischen MA-Konzentrationen.

In vielen Mikroorganismen ist die Aufnahme einer bestimmten Substanz direkt mit ihrem Verbrauch verknüpft (Javelle et al., 2005). Um eine mögliche Kopplung der MA-Aufnahmerate mit der Ammoniakoxidationsaktivität nachzuweisen, wurde der Einfluss einer AMO-Hemmung durch Acetylen auf die MA-Aufnahmeaktivität von *N. europaea* untersucht. Als erstes wurde hierzu die ATP- und NADH-Konzentration von „frischen“ und „hungernden“ Zellen bestimmt (Definition siehe Abb. 23, Weidinger et al., 2007). Während „frische Zellen“ eine ATP-Konzentration von  $6,9 \pm 0,5 \mu\text{mol ATP (g Protein)}^{-1}$  und eine NADH-Konzentration von  $8,8 \pm 1,3 \mu\text{mol NADH (g Protein)}^{-1}$  aufwiesen, war sowohl die ATP- als auch NADH-Konzentration in „hungernden Zellen“ beträchtlich geringer [ $0,1 \mu\text{mol ATP (g Protein)}^{-1}$  und  $0,3 \mu\text{mol NADH (g Protein)}^{-1}$ ].



**Abbildung 23:** Aufnahme von MA durch *N. europaea* mit aktiver oder durch Acetylen gehemmter AMO (Weidinger et al., 2007). Die MA-Konzentration wurde auf 10 mM und die Zelldichte auf  $5 \times 10^9$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  (entspricht  $0,8 \text{ mg Protein ml}^{-1}$ ) eingestellt. Der pH betrug 7,25. (■) MA-Aufnahme von „frischen Zellen“ (Zellen befanden sich vor Beginn des Versuches in einem Kulturmedium mit 25 mM Ammonium); (Δ) MA-Aufnahme von „Acetylen-gehemmten Zellen“; (●) MA-Aufnahme von „hungernden Zellen“ (Zellen wurden 5 Stunden vor Beginn des Versuches in ein Ammonium-freies Kulturmedium überführt) (□) MA-Aufnahme von „hungernden, Acetylen-gehemmten Zellen“.

Die MA-Aufnahmeaktivität von „Acetylen-gehemmten Zellen“ (Aktivität der AMO vollständig durch Acetylen gehemmt) unterscheidet sich nicht von der MA-Aufnahmeaktivität „frischer Zellen“. Die MA-Aufnahmeaktivität der „hungernden Zellen“ war im Gegensatz zur MA-Aufnahmeaktivität der „Acetylen-gehemmten Zellen“ sowie der „frischen Zellen“ in der ersten Minute allerdings deutlich geringer. Innerhalb der ersten Minute sank bei den „hungernden Zellen“ der periplasmatische pH auf einen Wert unter 6, gefolgt von einem Anstieg der MA-Aufnahmeaktivität (Minute 2 bis 4, Abb. 23). Im Gegensatz dazu verminderte sich der pH im Periplasma von „hungernden, Acetylen-gehemmten Zellen“ nicht und die MA-Aufnahmeaktivität blieb während des gesamten Experimentes stets gering (Abb. 23; Weidinger et al., 2007). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aufnahmeaktivität des Rh1-Transporters nicht von der Ammoniakoxidationsaktivität (und damit folglich der ATP- und NADH-Konzentration) der Zelle beeinflusst wird und dass ein niedriger pH im Periplasma benötigt wird ( $\text{pH} < 6$ ), um hohe MA-Aufnahmeaktivitäten zu ermöglichen.

Schmidt et al. (2004a) fanden heraus, dass *Nitrosomonas*-Zellen in der Lage sind, intrazellulär Ammonium in Konzentrationen bis zu 1 M zu akkumulieren. Diese Akkumulation kann jedoch nicht alleinig durch die Aktivität des Rh1-Transporters erklärt werden, da der Rh1-Transporter nur einen passiven Transport von Ammoniak und somit maximal einen Konzentrationsausgleich zwischen Medium und Cytoplasma ermöglicht. Während festgestellt wurde, dass das Membranpotential sowie die ATP- und NADH-Konzentration der Zelle keinen direkten Einfluss auf den Ammoniaktransport und die Ammoniumakkumulation besitzt, scheint jedoch der pH im Periplasma sowie der pH im Medium einen entscheidenden Faktor für die Ammoniumakkumulation darzustellen (Weidinger et al., 2007). Eine Erniedrigung des pH im Periplasma ist dabei mit einem signifikanten Anstieg der MA-Aufnahmeaktivität verbunden. Der pH-Wert des Mediums ( $\text{pH} 7 - 8$ ) unterscheidet sich von dem periplasmatischen pH aktiv Ammoniak-oxidierender *Nitrosomonas*-Zellen ( $\text{pH} < 6$ ) um bis zu drei pH-Einheiten. Dieser pH-Unterschied könnte eine Akkumulation von Ammonium um einen Faktor bis zu  $10^3$  im periplasmatischen Raum bewirken (Schmidt et al., 2004a, Weidinger et al., 2007). Durch diese „Säurefalle“ könnte Ammonium in hohen Konzentrationen im Periplasma angehäuft, und mittels Rh1 in Form von Ammoniak in das Cytoplasma ( $\text{pH} 7 - 8$ ; Kumar & Nicholas; 1983) transportiert werden (Gilch et al., 2009a). Die periplasmatische „Säurefalle“ könnte es *N. europaea* an Habitaten mit geringen Ammoniumkonzentrationen ermöglichen, erfolgreich mit anderen (heterotrophen) Mikroorganismen und Pflanzen um die Ressource Ammonium zu konkurrieren. Der Vorteil, nach längerer Hungerphase bereits in der lag-Phase sehr schnell

Ammonium durch eine Erniedrigung des periplasmatischen pH aufnehmen und akkumulieren zu können, könnte zudem ein entscheidender Faktor sein, warum sich *N. europaea* trotz seiner längeren Generationszeit und seines passiven Ammoniak-Transportsystems gegenüber den schnell wachsenden heterotrophen Bakterien mit aktiven Ammoniak-Transportsystemen (z. B. Stämme der Genera *Escherichia*, *Corynebacterium* oder *Bacillus*; Siewe et al., 1996; Javelle et al., 2005) im Wettstreit um die Ressource Ammonium behaupten kann.

#### **4.3 Transkriptionelle Regulation von Schlüsselenzymen des Energiestoffwechsels von *N. europaea* unter oxischen und anoxischen Bedingungen**

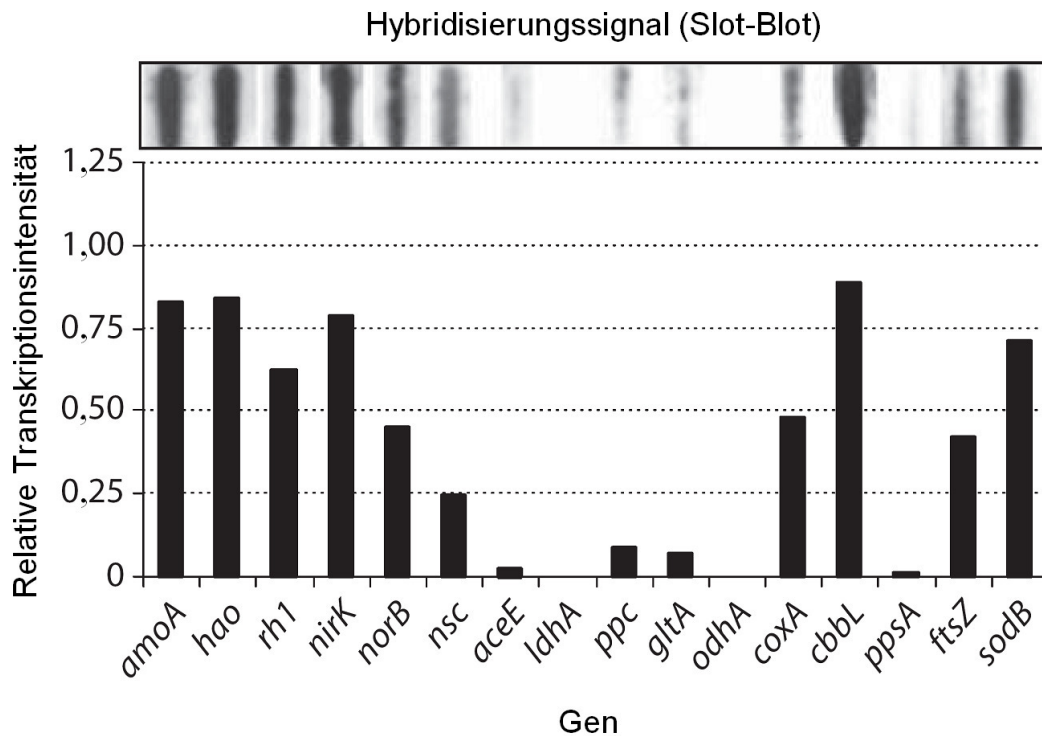
*N. europaea* ist in der Lage, sowohl unter oxischen als auch anoxischen Bedingungen zu wachsen. Die effektivste Art der Energiegewinnung stellt dabei die aerobe Oxidation von Ammoniak zu Nitrit dar, welche sequentiell durch die beiden Schlüsselenzyme AMO und HAO katalysiert wird (Rees & Nason, 1966; Dua et al., 1979; Anderson & Hooper, 1983; Hooper et al., 1997). Das Wachstum und die Ammoniakoxidationsaktivität aerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen kann darüber hinaus durch Zugabe geringer Mengen an NO<sub>2</sub> (50-250 ppm) oder NO (25-150 ppm) deutlich gesteigert werden (Zart & Bock, 1998; Zart et al., 2000; Schmidt et al., 2001b,c). Als chemolithoautotropher Organismus ist *N. europaea* befähigt, anorganisches CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle zu nutzen (Nicholas & Rao, 1964). In Abwesenheit von CO<sub>2</sub> ist *N. europaea* zudem in der Lage, chemolithoheterotroph mit Fruktose, Acetat oder Pyruvat als Kohlenstoffquelle zu wachsen (Martiny & Koops, 1982; Hommes et al., 2003).

Anaerobes Wachstum von *N. europaea* kann einerseits mit NH<sub>3</sub> als Elektronendonator und NO<sub>2</sub> als Oxidationsmittel sowie Nitrit als terminalen Elektronenakzeptor erfolgen. Die Reduktion von Nitrit (Denitrifikation) wird dabei durch die Nitrit-Reduktase (NirK) und die NO-Reduktase katalysiert (NorB; Schmidt & Bock, 1997; Schmidt et al., 2004b,c). Als Endprodukt der Denitrifikation wurde N<sub>2</sub> nachgewiesen, doch konnte bis jetzt noch keine N<sub>2</sub>O-Reduktase im Proteom von *N. europaea* identifiziert werden. Neben der anaeroben Denitrifikation mit Ammoniak als Elektronendonator (Chemolithoautotrophie) ist *N. europaea* ferner im Stande, unter Verwendung von Pyruvat oder Laktat als Elektronendonator, chemoorganotroph zu wachsen (Abeliovich & Vonshak, 1992; Bock et al., 1995; Schmidt et al., 2004c). Pyruvat und Laktat werden hierbei zu CO<sub>2</sub> oxidiert und Nitrit im Gegenzug zu NO, N<sub>2</sub>O und N<sub>2</sub> reduziert (siehe oben).

Die Fähigkeit von *N. europaea* unter oxischen als auch anoxischen Bedingungen, sowie mit CO<sub>2</sub> als auch organischen Substraten als Kohlenstoffquelle, wachsen zu können, bedingt einer vielfältigen genetischen Ausstattung. Dieses genetische Repertoire bedarf jedoch auch einer, besonders im Bezug auf den Energiestoffwechsel, komplexen und flexiblen Regulation. Für den passiven Ammoniaktransporter Rh1 konnte gezeigt werden, dass dessen Regulation größtenteils auf transkriptioneller Ebene erfolgt (Kapitel 4.2). Unter denitrifizierenden Bedingungen wird dabei die Transkription des *rhI*-Genes, in Anpassung an den im Vergleich zu nitrifizierenden Bedingungen um 99 % geringeren Ammoniakbedarf, um etwa 95 % reduziert (Weidinger et al., 2007). Da die Transkription von Rh1 mit dem Ammoniakbedarf der Zelle korreliert, stellt sich die Frage, inwieweit auch andere am Stoffwechsel und Wachstum von *N. europaea* beteiligten Proteine auf transkriptioneller Ebene reguliert werden. Aus diesem Grund wurde das Expressionsmuster von ausgewählten Genen in Abhängigkeit von den verschiedenen Wachstumsbedingungen, analysiert. Hierzu wurden die Wachstumsbedingungen in einem Turbidostaten so eingestellt, dass *N. europaea* nur durch einen bestimmten Stoffwechselweg (aerobe Nitrifikation mit O<sub>2</sub> als Elektronenakzeptor; anaerobe Nitrifikation mit NO<sub>2</sub> als Elektronenakzeptor; anaerobe Denitrifikation mit entweder Pyruvat oder Laktat als Substrat) in der Lage war, Energie zu erzeugen (Beyer et al., 2009). Die Auswahl der Gene, welche auf ihre Transkription untersucht werden sollten, erfolgte unter der Prämisse möglichst alle zentralen Funktionen des Stoffwechsels von *N. europaea* abzudecken. So wurden die Gene *amoA* (kodiert für die  $\alpha$ -Untereinheit der AMO), *hao* (kodiert für die homomultimeren HAO) und *rhI* (kodiert für einen Ammoniaktransporter des Rhesus-Typs; Weidinger et al., 2007) als Repräsentanten für die aerobe und anaerobe Ammoniakoxidation als auch für den Ammoniaktransport ausgewählt. Die Gene *nirK* (kodiert für eine Nitrit-Reduktase), *norB* (kodiert für eine NO-Reduktase), und *coxA* (kodiert für die Untereinheit I der Cytochrom-*c*-Oxidase) wurden als Vertreter der aeroben Atmung (Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor) und anaeroben Atmung (Nitrit als terminaler Elektronenakzeptor) selektiert (Abeliovich and Vonshak, 1992; Bock et al., 1995; Schmidt et al., 2004c). Die Genprodukte von *aceE* (kodiert für die E1-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase), *ldhA* (kodiert für die D-Laktat-Dehydrogenase), *ppc* (kodiert für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase), *gltA* (kodiert für die Citrat-Synthase) und *odhA* (kodiert für die E1-Untereinheit der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase) werden für die Metabolisierung von organischen Substraten benötigt und wurden deshalb als Marker für chemoorganotrophes Wachstum verwendet. Bis jetzt konnte die Kohlenstoffquelle bei anaeroben Wachstum von *N. europaea* mit Pyruvat als Substrat noch nicht eindeutig identifiziert werden und deshalb

wurde auch die Transkription von *cbbL* (kodiert für die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase) und *ppsA* (kodiert für eine Phosphoenolpyruvat-Synthase) unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen analysiert. *ftsZ* (kodiert für ein Zellteilungsprotein der FtsZ:Tubulin/FtsZ-Familie) wurde ausgewählt, um Informationen über die Regulation der Zellteilungsaktivität zu erhalten. Ebenso wurde die Transkriptionsintensität von *sodB* (kodiert für eine Superoxid-Dismutase) bestimmt, um Aufschluss über den oxidativen Stress von *N. europaea* zu erlangen.

Bei aerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen konnten starke Transkriptionsintensitäten für *amoA*, *hao*, *rh1*, *coxA* und *cbbL* ermittelt werden (Abb. 24). Die Transkriptionsintensitäten stimmen dabei mit den Aktivitäten der entsprechenden Genprodukte in *N. europaea* überein (Beyer et al., 2009). So werden bei der aeroben Oxidation von Ammoniak die Enzyme AMO und HAO für die Energiegewinnung, das Transportprotein Rh1 für den Ammoniaktransport in das Cytoplasma (Gilch et al., 2009a; Weidinger et al., 2007), die Cytochrom-*c*-Oxidase für die sauerstoffabhängige Atmungskette und die RubisCO für die autotrophe Fixierung von anorganischem CO<sub>2</sub> benötigt. Unter oxischen Bedingungen kann in *Nitrosomonas*-Kulturen neben der dominierenden Nitrifikation auch stets eine signifikante Denitrifikationsaktivität beobachtet werden (Poth & Focht, 1985; Schmidt et al., 2004c; Beyer et al., 2009). Es wird vermutet, dass in *N. europaea* die Denitrifikation unter oxischen Bedingungen zur Energiegewinnung (Zart & Bock, 1998) oder zur Entgiftung von Nitrit beiträgt (Beaumont et al., 2002, 2004, 2005). Dementsprechend konnte eine signifikante Menge an *nirK*- und *norB*-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 24). Aerob Ammoniak-oxidierende *Nitrosomonas*-Zellen verwenden Ammoniak als Elektronendonator (Chemolithotrophie) und folgerichtig konnte keine signifikante Transkription der am Glukoseabbau beteiligten Gene *aceE*, *ppc* und *gltA* beobachtet werden. *ppsA*, dessen Genprodukt bei Glukoneogenese von Pyruvat aus benötigt wird, wurde ebenfalls nur im geringen Maße transkribiert. *ldhA*- und *odhA*-Transkript konnte in aerob Ammoniak-oxidierende *Nitrosomonas*-Zellen gar nicht detektiert werden (Abb. 24; Beyer et al., 2009).

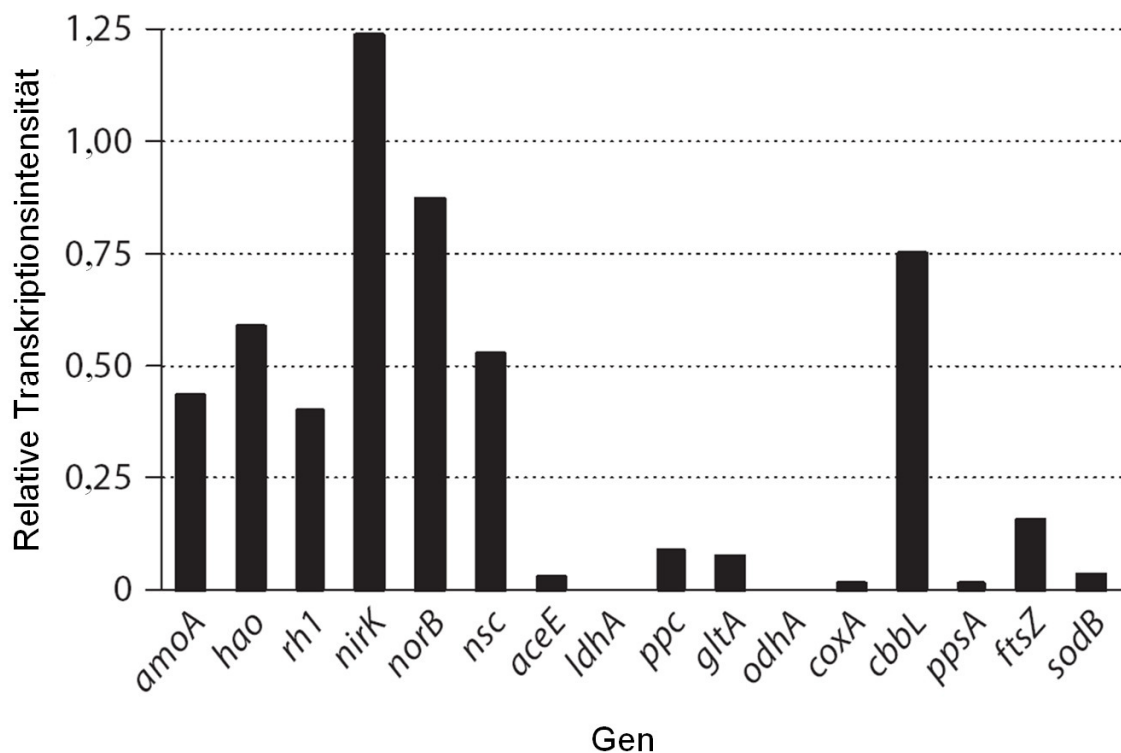


**Abbildung 24:** Hybridisierungssignal und zugehörige relative Transkriptionsintensität von *amoA*, *hao*, *rh1*, *nirK*, *norB*, *nsc*, *aceE*, *ldhA*, *ppc*, *gltA*, *odhA*, *coxA*, *cbbL*, *ppsA*, *ftsZ* und *sodB* von aerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen (Beyer et al., 2009). Die Transkriptionsintensitäten wurden als absolute Werte anhand der Größe und der Fläche der entsprechenden Hybridisierungssignale ermittelt. Das 16S-rRNA-Hybridisierungssignal wurde als Referenzsignal (Intensität = 100) gesetzt. Die Transkriptionsintensitäten der zu untersuchenden Gene wurden im Bezug auf das Referenzsignal der 16S-rRNA errechnet. Die angegebenen Werte repräsentieren den Mittelwert aus sechs unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. (SD:  $\pm 11\%$ ).

Die Transkriptionsintensitäten der ausgewählten Gene von anaerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen unterscheiden sich deutlich von den Transkriptionsintensitäten der aerob nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen (vergleiche Abb. 24 und 25; Beyer et al., 2009). Da anaerob Ammoniak-oxidierende Bakterien ebenfalls Rh1, AMO und HAO benötigen, um Ammoniak zu Nitrit zu oxidieren, konnten wie bei aerob nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen hohe Konzentrationen an *rh1*, *amoA*- und *hao*-mRNA nachgewiesen werden. Anaerob Ammoniak-oxidierende *Nitrosomonas*-Zellen weisen jedoch im Vergleich zu aerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen eine geringere Ammoniakoxida-tionsaktivität auf und daher liegen die mRNA-Konzentrationen von *rh1*, *amoA* und *hao* offensichtlich leicht unter denen von aerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen (vergleiche Abb. 24 und 25). Die verminderte Ammoniakoxida-tionsaktivität einer anaerob nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Kultur hat sowohl ein langsames Wachstum als auch eine geringere

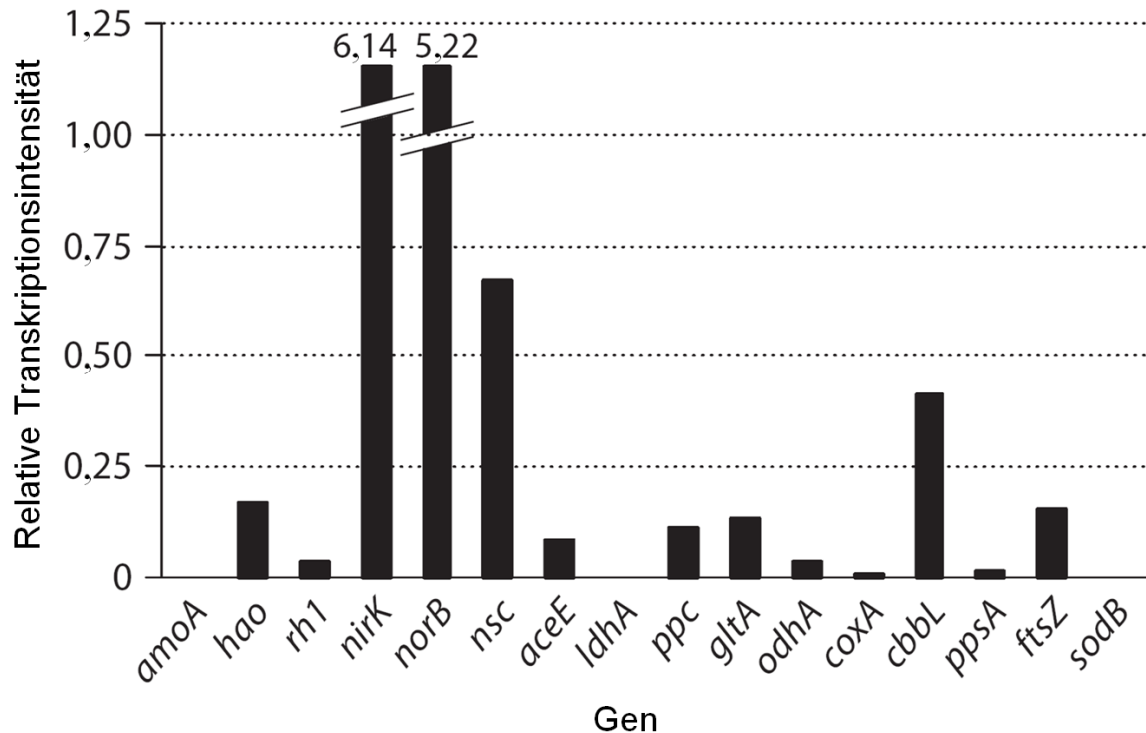


Zellteilungsrate zur Folge. Erwartungsgemäß konnte eine im Bezug auf aerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen reduzierte Transkriptionsintensität von *ftsZ* beobachtet werden. Die Transkriptionsintensität von *nirK* und *norB* stieg in Übereinstimmung mit der höheren Denitrifikationsaktivität indes an. *coxA*-mRNA konnte bei anaerob denitrifizierenden *Nitrosomonas*-Kulturen nur in sehr geringem Maße detektiert werden, da Nitrit und nicht mehr Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor fungiert. Die Abwesenheit von Sauerstoff führt weiterhin zu einem geringeren oxidativen Stress für *N. europaea*. Dies äußert sich in einer verminderten Transkription von *sodB*. *aceE*, *ppc*, *gltA* und *ppsA* wurden in aerob und anaerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen nur in sehr geringem Maße transkribiert, da beide Populationen chemolithoautotroph wachsen (Beyer et al., 2009). Die Gene *odhA* sowie *ldhA* wurden bei anaerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Kulturen gar nicht gar nicht exprimiert (Abb. 25).



**Abbildung 25:** Relative Transkriptionsintensität von *amoA*, *hao*, *rh1*, *nirK*, *norB*, *nsc*, *aceE*, *ldhA*, *ppc*, *gltA*, *odhA*, *coxA*, *cbbL*, *ppsA*, *ftsZ* und *sodB* in anaerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen (Beyer et al., 2009). Die Transkriptionsintensitäten wurden als absolute Werte anhand der Größe und der Fläche der entsprechenden Hybridisierungssignale ermittelt. Das 16S-rRNA-Hybridisierungssignal wurde als Referenzsignal (Intensität = 100) gesetzt. Die Transkriptionsintensitäten der zu untersuchenden Gene wurden im Bezug auf das Referenzsignal der 16S-rRNA berechnet. Die angegebenen Werte repräsentieren den Mittelwert aus sechs unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. (SD:  $\pm 9\%$ ).

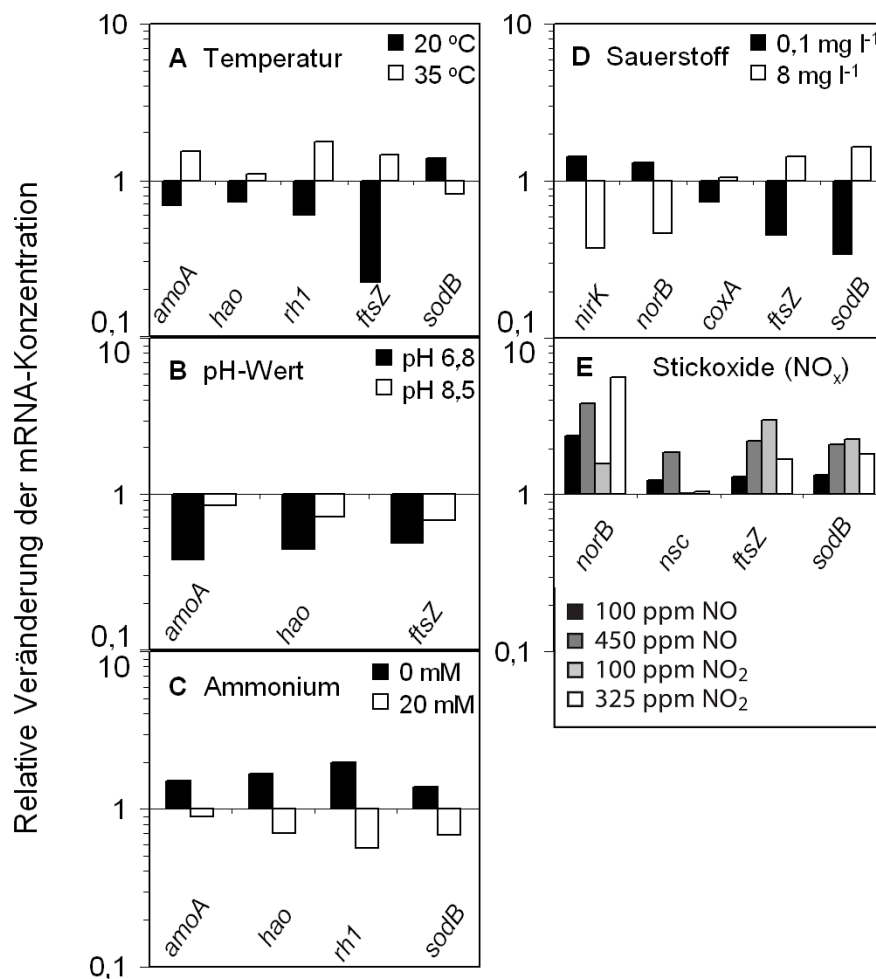
In denitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen dient im Gegensatz zu nitrifizierenden Zellen nicht mehr Ammoniak, sondern Pyruvat oder Laktat als Energiequelle (Schmidt et al., 2004c). Folglich konnte unter denitrifizierenden Bedingungen weder AMO-Protein (Schmidt et al., 2001b) noch *amoA*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 26; Beyer et al., 2009). Die Menge an *rhl*-mRNA war bei denitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen ebenfalls sehr gering. Interessanterweise konnte allerdings eine signifikante Menge an *hao*-Transkript festgestellt werden. Da denitrifizierende *Nitrosomonas*-Zellen kein Ammoniak oxidieren, bleibt die metabolische Funktion der HAO unter diesen Wachstumsbedingungen jedoch noch ungeklärt. Denitrifizierende *Nitrosomonas*-Zellen zeigten im Vergleich zu nitrifizierenden Zellen eine gesteigerte Transkriptionsaktivität für die Gene *nirK* und *norB*. Da auf Pyruvat wachsende *Nitrosomonas*-Kulturen gegenüber chemolithotrophen Kulturen eine höhere Denitrifikationsaktivität aufweisen (Schmidt et al., 2004c), regelt *N. europaea* offensichtlich die Expression der an der Denitrifikation beteiligten Proteine NirK und NOR auf transkriptioneller Ebene. Anaerob denitrifizierende *Nitrosomonas*-Zellen weisen zudem eine mehr als verdoppelte Transkriptionsintensität der Gene *aceE*, *ppc* und *gltA* auf. Durch das langsame Wachstum der Bakterien bedingt, konnten nur geringe Mengen des *ftsZ*-Transkripts nachgewiesen werden, und *sodB*- als auch *coxA*-mRNA waren aufgrund der anoxischen Wachstumsbedingungen gar nicht zu detektieren. *ldhA*-mRNA war in *Nitrosomonas*-Zellen, welche auf Pyruvat wuchsen, nicht nachweisbar. Es konnte allerdings, nachdem den Bakterien Laktat als Kohlenstoffquelle angeboten wurde, eine Transkription des *ldhA*-Gens (0,04 % der Intensität der 16S-rRNA) nachgewiesen werden. Die Beobachtung, dass *cbbL* auch bei anaerob denitrifizierenden *Nitrosomonas*-Kulturen in signifikantem Maßstab transkribiert wird, könnte darauf hindeuten, dass CO<sub>2</sub> weiterhin als Kohlenstoffquelle genutzt wird. Interessanterweise wurde auch eine signifikante Konzentration an *odhA*-mRNA in denitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen nachgewiesen (Abb. 26; Beyer et al., 2009). In aerob und auch anaerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Zellen konnte dagegen weder *odhA*-Transkript (Abb. 24 und 25; Beyer et al., 2009) noch 2-Oxoglutarat-Dehydrogenaseaktivität nachgewiesen werden (Hooper, 1969). Es wurde daher angenommen, dass sowohl aerob als auch anaerob Ammoniak-oxidierende *Nitrosomonas*-Zellen einen unvollständigen Tricarbonsäurezyklus besitzen. Der Nachweis von *odhA*-mRNA in denitrifizierenden *Nitrosomonas*-Kulturen komplettiert somit den Tricarbonsäurezyklus und stellt damit die Grundlage für das chemoorganotrophe Wachstum von *N. europaea*.



**Abbildung 26:** Relative Transkriptionsintensität von *amoA*, *hao*, *rh1*, *nirK*, *norB*, *nsc*, *aceE*, *ldhA*, *ppc*, *gltA*, *odhA*, *coxA*, *cbbL*, *ppsA*, *ftsZ* und *sodB* in anaerob denitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen mit Pyruvat als alleiniger Energiequelle (Beyer et al., 2009). Die Transkriptionsintensitäten wurden als absolute Werte anhand der Größe und der Fläche der entsprechenden Hybridisierungssignale ermittelt. Das 16S-rRNA-Hybridisierungssignal wurde als Referenzsignal (Intensität = 100) gesetzt. Die Transkriptionsintensitäten der zu untersuchenden Gene wurden im Bezug auf das Referenzsignal der 16S-rRNA berechnet. Die angegebenen Werte repräsentieren den Mittelwert aus sechs unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. (SD:  $\pm 15\%$ ).

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss der Temperatur, des pH-Werts, sowie der  $\text{NH}_3$ -,  $\text{NO}$ -,  $\text{NO}_2$ - und  $\text{O}_2$ -Konzentration auf die Transkriptionsintensitäten der ausgewählten Gene von aerob nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Zellen analysiert (Abb. 27; Beyer et al., 2009). Interessanterweise konnte im Turbidostat die höchste Ammoniakoxidationsaktivität [ $40,62 \pm 3,63 \text{ nmol (mg Protein}^{-1}) \text{ min}^{-1}$ ] und die höchste Wachstumsrate ( $0,21 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ ) bei einer Temperatur von  $35^\circ\text{C}$  beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist überraschend, da von Wullenweber et al. (1978) ein physiologisches Temperaturoptimum für *N. europaea* zwischen  $25$  und  $30^\circ\text{C}$  postuliert wurde. Gegenüber den „Standardbedingungen“ ( $5 \pm 2 \text{ mM NH}_4^+$ ;  $5 \pm 0,2 \text{ mg l}^{-1} \text{ O}_2$ ;  $28^\circ\text{C}$ ; pH 7,4) war zudem bei einer Temperatur von  $35^\circ\text{C}$  die Konzentration an *amoA*-, *hao*-, *rh1*- und *ftsZ*-mRNA nahezu verdoppelt (Abb. 27A). Temperaturen über  $37^\circ\text{C}$  führten dagegen zu einem drastischen Rückgang der Ammoniakoxidationsaktivität (Beyer et al., 2009). Durch ein Absenken der Temperatur auf  $20^\circ\text{C}$  reduzierte sich die Transkriptionsintensität von *amoA*, *hao*, *rh1* und *ftsZ* maßgeblich.

Neben einer Veränderung der Temperatur reagiert *N. europaea* auch transkriptionell auf eine Veränderung des externen pH-Werts (Abb. 27B). Eine Abweichung vom physiologisch optimalen pH-Wert (pH 7,4) zu höheren (pH 8,5) oder niedrigeren pH-Werten (pH 6,8) führt in beiden Fällen zu einem signifikanten Rückgang der *amoA*, *hao* und *ftsZ*-Transkriptionsaktivität.



**Abbildung 27:** Relative Veränderung der mRNA-Konzentration ausgewählter Gene in *N. europaea* als Reaktion auf eine Veränderung der Temperatur (A), des pH-Wertes (B), der Ammoniumkonzentration (C), der Sauerstoffkonzentration (D) als auch der NO- und NO<sub>2</sub>-Konzentration (E) (Beyer et al., 2009). Die jeweiligen Intensitäten der Hybridisierungssignale wurden bezüglich der Intensitäten der Hybridisierungssignale unter nitrifizierenden „Standardbedingungen“ (5 ± 2 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; 5 ± 0,2 mg l<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>; 28 °C; pH 7,4) normalisiert. Es wurde jeweils nur ein Parameter bezüglich der „Standardbedingungen“ verändert. Es sind nur diejenigen Gene aufgeführt, deren Transkriptionsintensität sich um mehr als 25 % veränderte. Alle angegebenen Werte repräsentieren den Mittelwert aus sechs unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. (SD: ± 12 %).

Eine Limitierung von Ammonium führte zu einem deutlichen Anstieg der *amoA*-, *hao*-, *rhI*- und *sodB*-mRNA Konzentration (Abb. 27C). Augenscheinlich wirkt *N. europaea* der Substratlimitierung durch eine vermehrte Produktion der für die Energiegewinnung relevanten Proteine (AMO, HAO und RhI) entgegen. Der Anstieg an *sodB*-mRNA könnte durch eine infolge der Substratlimitierung gestiegene intrazelluläre Sauerstoffkonzentration verursacht werden. Eine Limitierung von Ammonium führt ebenso wie eine Temperaturverringerung (Abb. 27A) zu einer verminderten Ammoniakoxidationsaktivität und damit zu einem geringeren Sauerstoffverbrauch. Durch eine vermehrte Transkription von *sodB* scheint *N. europaea* dem daraus resultierenden oxidativem Stress entgegenzuwirken. Eine Limitierung von Sauerstoff führt entsprechend dieser Vermutung zu einer signifikanten Abnahme an *sodB*-mRNA (Abb. 27D). Geringe Sauerstoffkonzentrationen verursachen zudem eine vermehrte Transkription von *nirK* und *norB* als auch eine reduzierte Transkription von *coxA*, da bei geringer O<sub>2</sub>-Konzentration vermehrt Nitrit anstelle von Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor verwendet wird (Abb. 27D; Beyer et al., 2009).

Die Zugabe von Stickoxiden (NO und NO<sub>2</sub>) führte, wie erwartet, zu einem deutlichen Anstieg der Ammoniakoxidationsaktivität (Zart & Bock, 1998, Zart et al., 2000; Schmidt et al., 2001b,c; Beyer et al., 2009). Überraschenderweise konnte jedoch kein signifikanter Anstieg der Transkriptionsintensitäten von *amoA*, *hao* oder *rhI* beobachtet werden (Abb. 27E). Stattdessen konnte ein erhöhter Gehalt an *norB*-, *nsc*-, *ftsZ*- und *sodB*-mRNA nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Stickoxide die Ammoniakoxidationsaktivität nicht auf transkriptioneller sondern auf posttranslationaler Ebene beeinflussen. Da die initiale Oxidation von Ammoniak zu Hydroxylamin durch die AMO den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Ammoniakoxidation darstellt, lässt sich vermuten, dass Stickoxide demnach die spezifische Aktivität der AMO erhöhen.

#### 4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

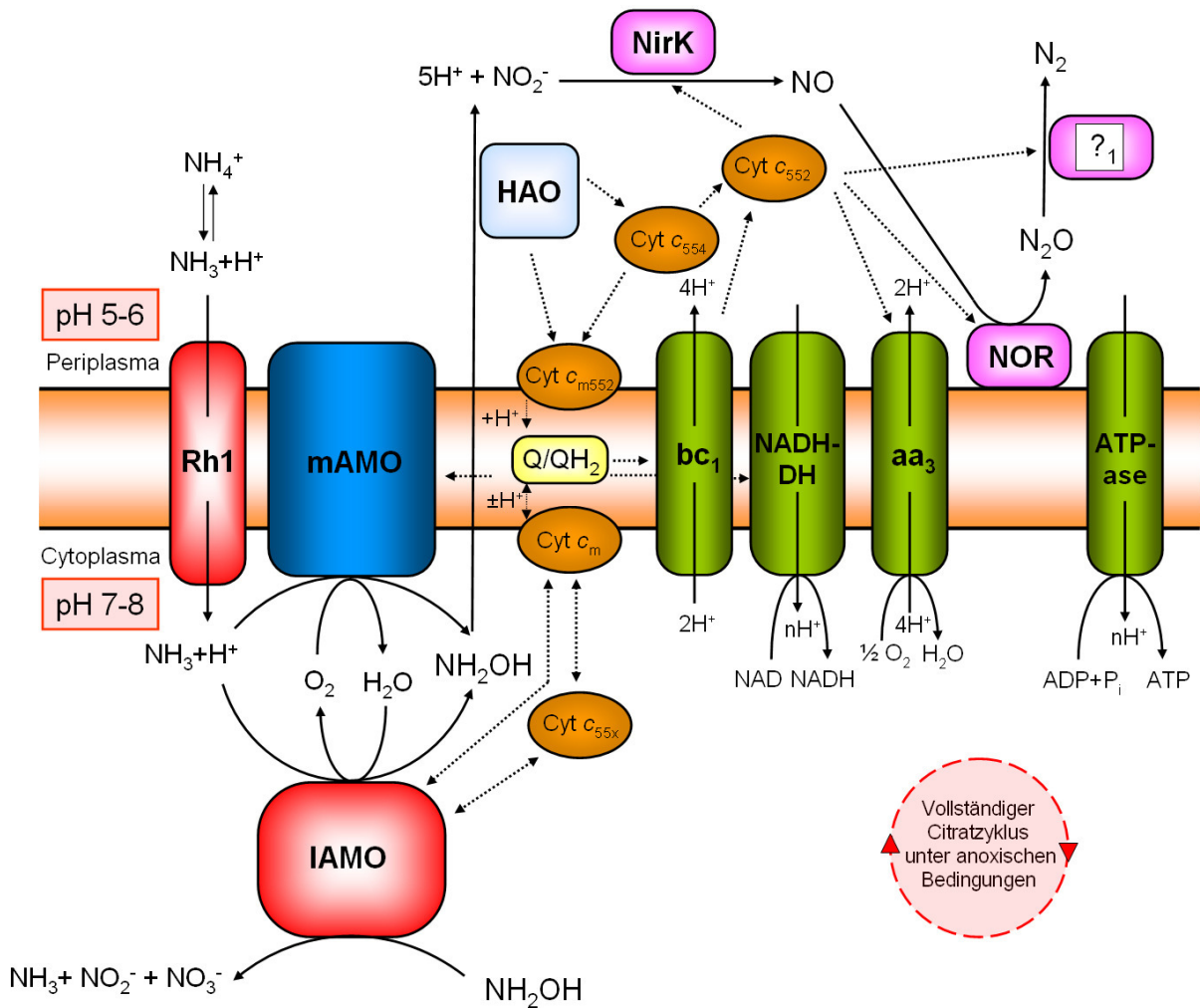
Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass *N. europaea* neben der membrangebundenen AMO auch eine lösliche AMO besitzt. Beide Formen sind katalytisch aktiv und sind in annähernd gleichen Mengen mit nahezu identischen spezifischen Aktivitäten in der Membran beziehungsweise im Cytoplasma von *N. europaea* lokalisiert. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte die lösliche Form der AMO gereinigt und sowohl strukturell als auch biochemisch charakterisiert werden. Die lösliche AMO besitzt eine molekulare Masse von ungefähr

316 kDa und weist eine heterotrimere Untereinheitenstruktur auf. Am Aufbau des  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ -Heterotrimers sind die Untereinheiten AmoA ( $\alpha$ ; 27 kDa), AmoB ( $\beta$ ; 42 kDa) und Cyt  $c_1$  ( $\gamma$ ; 24 kDa) beteiligt. Die AmoB-Untereinheit der löslichen AMO besitzt eine 25 Aminosäuren lange hydrophobe Signalsequenz, welche bei der AmoB-Untereinheit der membran- gebundenen Form bereits abgespalten ist. Das Vorhandensein dieser Sequenz könnte demnach die Faltung der AMO soweit beeinflussen, dass potentielle Membrandomänen im Inneren des Proteins verborgen bleiben und das Enzym somit in einer löslichen Konformation vorliegt. Für die lösliche AMO könnten sowohl ein cytoplasmatisches Cytochrom  $c_{550}$ ,  $c_{552}$  oder  $c_{554}$  als auch ein membrangebundenes Cyt  $c_m$  als potentieller Elektronendonator (Ammoniak-oxidation) beziehungsweise Elektronenakzeptor (Disproportionierung von Hydroxylamin) in Frage kommen (Abb. 28; Miller & Wood, 1982; Andersson et al., 1986). Ebenso wie die lösliche AMO oxidiert wahrscheinlich auch die membrangebundene AMO ihr Substrat Ammoniak im Cytoplasma, da der pH im Periplasma ( $\text{pH} < 6$ ; Weidinger et al., 2007) zu gering ist, um Ammoniakoxidation durch die AMO zu ermöglichen (Suzuki et al., 1974; Schmidt et al., 1998). Eine cytoplasmatische Lokalisation des aktiven Zentrums der membrangebundenen AMO würde zudem zum Aufbau des Protonengradienten beitragen, da bei der Oxidation von Ammoniak zwei Protonen (und Elektronen) verbraucht werden.

Die lösliche AMO ( $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ ) koordiniert 9,5 Cu-, 3,9 Fe- (sowohl Häm-gebundenes als auch nicht Häm-gebundenes Fe) und 0,5 bis 2,6 Zn-Atome. Sechs der  $\sim 9$  Cu-Atome liegen dabei als  $\text{Cu}^{2+}$ -Atome und  $\sim 3$  als  $\text{Cu}^{1+}$ -Atome vor. Die  $\text{Cu}^{1+}$ -Atome verbleiben dabei nach Oxidation zu  $\text{Cu}^{2+}$  enzymgebunden. Dieser Umstand lässt auf eine Beteiligung der  $\text{Cu}^{1+}$ -Atome an redoxaktiven Vorgängen schließen. Die drei  $\text{Cu}^{1+}$ -Atome werden jeweils von den drei AmoA-Untereinheiten des heterotrimeren AMO-Komplexes koordiniert. Als Kandidat für die  $\text{Cu}^{1+}$ -Bindung an AmoA konnte das Motiv Asp 187 - X<sub>3</sub> - His 191 - X<sub>12</sub> - His 204 identifiziert werden, da der substratanaloge irreversible Hemmstoff Acetylen unter Freisetzung eines enzymgebundenen  $\text{Cu}^{1+}$ -Atoms an His 191 der AmoA-Untereinheit bindet. Acetylen wird dabei als Substratanalog zu Ammoniak unter Katalyse der AMO zu einem Keten monooxygeniert, welches kovalent an His 191 der AmoA-Untereinheit bindet, ein  $\text{Cu}^{1+}$ -Atom freisetzt und somit zu einer irreversible Hemmung der AMO führt.

Die lösliche AMO katalysiert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Disproportionierung von Hydroxylamin zu Ammoniak, Nitrit und Nitrat (Abb. 28). Bei der Umsetzung von 3,2 Molekülen Hydroxylamin werden dabei zwei Reduktionsäquivalente gebildet. Dieser Energiegewinn reicht *N. europaea* jedoch offensichtlich nicht aus, um auf Hydroxylamin als alleinigem Substrat zu wachsen. Für die Disproportionierung von Hydroxylamin durch die

lösliche AMO konnte ein  $K_m$ -Wert von ungefähr 140  $\mu\text{M}$  bestimmt werden. Dieser Wert entspricht in etwa dem Wert der für *N. europaea* toxischen Hydroxylaminkonzentration. Es wäre deshalb denkbar, dass die Disproportionierung von Hydroxylamin genutzt wird, um einer cytoplasmatischen Akkumulation von Hydroxylamin entgegenzuwirken. *N. europaea* würde bei der Detoxifizierung von Hydroxylamin durch die AMO zudem größtenteils ihr energielieferndes Substrat Ammoniak zurückgewinnen, welches zu einem späteren Zeitpunkt wieder unter Energiegewinn oxidiert werden könnte.



**Abbildung 28:** Schematische Darstellung des Energiestoffwechsels in *N. europaea* unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit neu hinzugewonnenen Erkenntnisse (rote Einfärbung). Ein Transfer von Elektronen und Reduktionsäquivalenten ( $\text{H}^+ + \text{e}^-$ ) ist durch gestrichelte Pfeile dargestellt. IAMO: lösliche Ammoniak-Monooxygenase; mAMO: membrangebundene Ammoniak-Monooxygenase; Rh1: Ammoniaktransporter vom Rhesus-Typ; HAO: Hydroxylamin-Oxidoreduktase; NirK: Nitrit-Reduktase; NOR: NO-Reduktase; Cyt  $c_{m552}$ : membranständiges Cytochrom  $c_{552}$ ; Cyt  $c_{552}$  und Cyt  $c_{554}$ : lösliche Cytochrome  $c_{552}$  und  $c_{554}$ ; Cyt  $c_m$ : membranständiges Cytochrom; Cyt  $c_{55x}$ : lösliches Cytochrom  $c_{550}$ ,  $c_{552}$  oder  $c_{554}$ ; Q/QH<sub>2</sub>: Ubichinon-Ubichinol-Pool; NADH-DH: NADH-Dehydrogenase (Komplex I);  $\text{bc}_1$ : Cytochrom- $\text{bc}_1$ -Komplex (Komplex III);  $\text{aa}_3$ : terminale Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV); ?<sub>1</sub>: unbekannter Mechanismus der  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktion.

Die lösliche AMO ist durch die initiale Oxidation von Ammoniak zu Hydroxylamin maßgeblich am Energiestoffwechsel von *N. europaea* beteiligt. Ein Ammoniaktransporter vom Rhesus-Typ (Rh1) beschleunigt dabei den Transport von Ammoniak in das Cytoplasma (Abb. 28). Messungen der pH-Abhängigkeit der Transportaktivität deuten dabei auf ungeladenen Ammoniak und nicht auf das Ammonium-Kation als transportierte Spezies hin. *N. europaea* akkumuliert darüber hinaus Ammonium durch eine Absenkung des periplasmatischen pH („Säurefalle“). Der pH-Unterschied zwischen Medium (pH 7 - 8) und Periplasma (pH < 6) ermöglicht dabei eine Akkumulation von Ammonium um einen Faktor bis zu  $10^3$  gegenüber der Ammoniumkonzentration im Medium.

*N. europaea* ist in der Lage, sowohl unter oxischen als auch anoxischen Bedingungen zu wachsen. Um sich den jeweiligen vorherrschenden Wachstumsbedingungen optimal anzupassen, reguliert *N. europaea* die Expression der für aerobes beziehungsweise anaerobes Wachstum notwendigen Enzyme auf transkriptioneller Ebene. Aerob Ammoniak-oxidierende *Nitrosomonas*-Kulturen transkribieren in hohem Maße die Gene *rh1*, *amoA*, *hao* (Ammoniaktransport und Ammoniakoxidation), *cbbL*, *ftsZ* (CO<sub>2</sub>-Fixierung und Zellteilung) sowie *nirK* und *norB* (Reduktion von Nitrit). Anaerob Ammoniak-oxidierende *Nitrosomonas*-Kulturen besitzen im Vergleich zu aerob nitrifizierenden *Nitrosomonas*-Kulturen eine geringere Konzentration an *amoA*-, *hao*-, *rh1*-, *coxA*-, *cbbL*-, *ftsZ*- und *sodB*-mRNA, sowie eine höhere Konzentration an *nirK*- und *norB*-Transkript. Bei auf Pyruvat wachsenden denitrifizierenden *Nitrosomonas*-Kulturen konnte ferner eine verstärkte Transkription der *nirK*-, *norB*-, *aceE*-, *gltA*- und *odhA*-Gene nachgewiesen werden. Die Transkription von *amoA*, *hao*, *rh1*, *coxA*, *cbbL*, *ftsZ* und *sodB* war dagegen signifikant reduziert. Eine Veränderung der Temperatur, des pH, der O<sub>2</sub> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Konzentration sowie der Zusatz von Stickoxiden zu aerob Ammoniak-oxidierenden *Nitrosomonas*-Kulturen hatte eine vergleichsweise geringfügige Veränderung des Transkriptionsmusters von *N. europaea* zur Folge.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig eine lösliche AMO aus *N. europaea* identifiziert, isoliert und charakterisiert. Basierend auf diesen Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass die lösliche AMO durch die Oxidation von Ammoniak sowohl zur Energiegewinnung und durch die Disproportionierung von Hydroxylamin zu dessen Detoxifizierung in *N. europaea* beiträgt. Des Weiteren liefert diese Arbeit Hinweise darauf, dass sich das aktive Zentrum der löslichen AMO innerhalb der AmoA-Untereinheit befindet und dort His 191 zur Koordinierung eines katalytischen Cu<sup>1+</sup>-Atoms beiträgt. Ein



Ammoniaktransporter des Rhesus-Typs beschleunigt den Transport von Ammoniak in das Cytoplasma. Diese Ergebnisse erweitern und verändern somit das derzeit bestehende Modell des Energiestoffwechsels der Ammoniak-oxidierenden Bakterien maßgeblich (vergleiche Abb. 3 und 28), doch bleiben noch einige Details bezüglich der Struktur und Physiologie der löslichen AMO sowie des Energiestoffwechsels in *N. europaea* ungeklärt. Diese Arbeit schuf jedoch, durch die erstmalige strukturelle, biochemische und physiologische Charakterisierung der gereinigten löslichen AMO beste Voraussetzungen, um die verbleibenden Fragestellungen durch weitere Forschung in detaillierter Weise zu beantworten.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abeliovich, A. & Vonshak, A.** (1992) Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **158**, 267-270.
- Alluisetti, G. E., Almaraz, A. E., Amorebieta, V. T., Doctorovich, F. & Olabe, J. A.** (2004) Metal-catalyzed anaerobic disproportionation of hydroxylamine. Role of diazene and nitroxyl intermediates in the formation of N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, NO<sup>+</sup>, and NH<sub>3</sub>. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13432-13442.
- Anderson, K. K. & Hooper, A. B.** (1983) O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O are each the source of one O in NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produced from NH<sub>3</sub> by *Nitrosomonas*; <sup>15</sup>N-NMR evidence. *FEBS Lett.* **164**, 236-240.
- Anderson, N., Strader, R. & Davidson, C.** (2003) Airborne reduced nitrogen: ammonia emissions from agriculture and other sources. *Environ. Int.* **29**, 277-286.
- Andersson, K. K., Lipscomb, J. D., Valentine, M., Münck, E. & Hooper, A. B.** (1986) Tetraheme cytochrome *c*-554 from *Nitrosomonas europaea*. Heme-heme interactions and ligand binding. *J. Biol. Chem.* **261**, 1126-1138.
- Arciero, D. M., Lipscomb, J. D., Huynh, B. H., Kent, T. A. & Münck, E.** (1983) Evidence for direct substrate binding to the active site Fe<sup>2+</sup> of extradiol dioxygenases. *J. Biol. Chem.* **258**, 14981-14991.
- Arp, D. J., Chain, P. S. & Klotz, M. G.** (2007) The impact of genome analyses on our understanding of ammonia-oxidizing bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 503-528.
- Arp, D. J., Sayavedra-Soto, L. A. & Hommes, N. G.** (2002) Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **178**, 250-255.

- Arp, D. J. & Stein, L. Y.** (2003) Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 471-495.
- Balasubramanian, R. & Rosenzweig, A. C.** (2007) Structural and mechanistic insights into methane oxidation by particulate methane monooxygenase. *Acc. Chem. Res.* **40**, 573-580.
- Basu, P., Katterle, B., Andersson, K. K. & Dalton, H.** (2003) The membrane-associated form of methane mono-oxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a copper/iron protein. *Biochem. J.* **369**, 417-427.
- Beaumont, H. J. E., Hommes, N. G., Sayavedra-Soto, L. A., Arp, D. J., Arciero, D. M., Hooper, A. B., Westerhoff, H. V. & van Spanning, R. J.** (2002) Nitrite reductase of *Nitrosomonas europaea* is not essential for production of gaseous nitrogen oxides and confers tolerance to nitrite. *J. Bacteriol.* **184**, 2557-2560.
- Beaumont, H. J. E., Lens, S. I., Reijnders, W. N., Westerhoff, H. V. & van Spanning, R. J.** (2004) Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea* involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcription repressor. *Mol. Microbiol.* **54**, 148-158.
- Beaumont, H. J. E., Lens, S. I., Westerhoff, H. V. & van Spanning, R. J.** (2005) Novel *nirK* cluster genes in *Nitrosomonas europaea* are required for NirK-dependent tolerance to nitrite. *J. Bacteriol.* **187**, 6849-6851.
- Bedard, C. & Knowles, R.** (1989) Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.* **53**, 68-84.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S.** (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**, 783-795.
- Bergmann, D. J. & Hooper, A. B.** (1994) Sequence of the gene *amoB* for the 43-kDa polypeptide of ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 759-762.

- Beyer, S., Gilch, S., Meyer, O. & Schmidt, I.** (2009) Transcription of genes coding for metabolic key functions in *Nitrosomonas europaea* during aerobic and anaerobic growth. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 187-197.
- Bock, E., Koops, H.-P., Harms, H. & Ahlers, B.** (1991) The biochemistry of nitrifying organisms. pp. 171-200. In J. M. Shively (Hrsg.), Variations of autotrophic life. Academic Press, London, United Kingdom.
- Bock, E., Schmidt, I., Stüven, R. & Zart, D.** (1995) Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonia or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* **163**, 16-20.
- Boettcher, B. & Koops, H.-P.** (1994) Growth of lithotrophic ammonium-oxidizing bacteria on hydroxylamine. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**, 253-266.
- Bollmann, A., Bar-Gilissen M. J. & Laanbroek H. J.** (2002) Growth at low ammonium concentrations and starvation response as potential factors involved in niche differentiation among ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4751-4757.
- Bothe, H., Jost, G., Schlöter, M., Ward, B. B. & Witzel, K.** (2000) Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 673-690.
- Broda, E.** (1975) The history of inorganic nitrogen in the biosphere. *J. Mol. Evol.* **7**, 87-100.
- Burton, S. A. Q. & Prosser, J. I.** (2001) Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2952-2957.
- Cantera, J. J. & Stein, L. Y.** (2007) Role of nitrite reductase in the ammonia-oxidizing pathway of *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **188**, 349-354.
- Camargo, J. A. & Alonso, A.** (2006) Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Int.* **32**, 831-849.

- Chain, P., Lamerdin, J., Larimer, F., Regala, W., Lao, V., Land, M., Hauser, L., Hooper, A. B., Klotz, M., Norton, J., Sayavedra-Soto, L. A., Arciero, D., Hommes, N. G., Whittaker, M. & Arp, D. J.** (2003) Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **185**, 2759-2773.
- Chan, S. I., Chen, K. H.-C., Yu, S. S.-F., Chen, C.-L. & Kuo, S. S.-J.** (2004) Toward delineating the structure and function of the particulate methane monooxygenase from methanotrophic bacteria. *Biochemistry* **43**, 4421-4430.
- Chapman, B. D., Schleicher, M., Beuger, A., Gostomski, P. & Thiele, J. H.** (2006) Improved methods for the cultivation of the chemolithoautotrophic bacterium *Nitrosomonas eutropha*. *J. Microbiol. Meth.* **65**, 96-106.
- Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P. C.** (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 192-208.
- Chen, P. P. & Chan, S. I.** (2006) Theoretical modeling of the hydroxylation of methane as mediated by the particulate methane monooxygenase. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 801-809.
- Chen, P. P. & Solomon, E. I.** (2004) O<sub>2</sub> activation by binuclear Cu sites: noncoupled versus exchange coupled reaction mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13105-13110.
- Chen, P. P., Yang, R. B., Lee, J. C. & Chan, S. I.** (2007) Facile O-atom insertion into C-C and C-H bonds by a trinuclear copper complex designed to harness a singlet oxene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 14570-14575.
- Cherif-Zahar, B., Durand, A., Schmidt, I., Matic, I., Merrick, M. & Matassi, G.** (2007) Evolution and functional characterisation of the RH50 gene from the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **189**, 9090-9100.

- Choi, D. W., Kunz, R. C., Boyd, E. S., Semrau, J. D., Antholine, W. E., Han, J. I., Zahn, J. A., Boyd, J. M., de la Mora, A. M. & DiSpirito, A. A.** (2003) The membrane-associated methane monooxygenase (pMMO) and pMMO-NADH:quinone oxidoreductase complex from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Bacteriol.* **185**, 5755-5764.
- De Boer, W. & Kowalchuk, G. A.** (2001) Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* **33**, 853-866.
- De Bruijn, P., van de Graaf, A.A. & Jetten, M. S. M.** (1995) Growth of *Nitrosomonas europaea* on hydroxylamine. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 179-184.
- DiSpirito, A. A., Lipscomb, J. D. & Hooper, A. B.** (1986) Cytochrome *aa3* from *Nitrosomonas europaea*. *J. Biol. Chem.* **268**, 17048-17056.
- DiSpirito, A. A., Taaffe, L. R. & Hooper, A. B.** (1985) Localization and concentration of hydroxylamine oxidoreductase and cytochromes *c*-552, *c*-554, *c<sub>m</sub>*-553, *c<sub>m</sub>*-552 and *a* in *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta* **806**, 320-330.
- Drozd, J. W.** (1976) Energy coupling and respiration in *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **110**, 257-262.
- Drozd, J. W.** (1980) Respiration in the ammonia oxidizing chemoautotrophic bacteria. pp. 87-111. In C. J. Knowles (Hrsg.), Diversity of bacterial respiratory systems, Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Dua, R. D., Bhandari, B. & Nicholas, D. J. D.** (1979) Stable isotope studies on the oxidation of ammonia to hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Lett.* **106**, 401-404.
- Ensign, S. A., Hyman, M. R. & Arp, D. J.** (1993) *In vitro* activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. *J. Bacteriol.* **175**, 1971-1980.
- Erickson, R. H. & Hooper, A. B.** (1972) Preliminary characterization of a variant CO-binding heme protein from *Nitrosomonas*. *Biochim. Biophys. Acta* **275**, 231-244.

- Erismann, J. W., Bleeker, A., Galloway, J. & Sutton, M. S.** (2007) Reduced nitrogen in ecology and the environment. *Environ. Pollut.* **150**, 140-149.
- Ferguson, S. J.** (1998) Nitrogen cycle enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 182-193.
- Fomina, L., Vazquez, B., Tkatchouk, E. & Fomine, S.** (2002) The Glaser reaction mechanism. A DFT study. *Tetrahedron Lett.* **58**, 6741-6747.
- Frankland, P. F. & Frankland, G. C.** (1890) The nitrifying process and its specific ferment. *Part I Phil. Trans. R. Soc. B.* **181**, 107-128.
- Frühling, W., Rönnpagel, K. & Ahlf, W.** (2001) Effect of zinc and benzalkonium chloride on *Nitrosomonas communis* and potential nitrification in soil. *Environ. Toxicol.* **16**, 439-443.
- Gilch, S., Meyer, O. & Schmidt, I.** (2009a) A soluble form of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *Biol. Chem.* Published online. DOI: 10.1515/BC.2009.085.
- Gilch, S., Vogel, M., Lorenz, M. W., Meyer, O. & Schmidt, I.** (2009b) Interaction of the mechanism-based inactivator acetylene with ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Microbiology* **155**, 279-284.
- Gilch, S., Meyer, O. & Schmidt, I.** (eingereicht) Electron paramagnetic studies of the copper and iron containing soluble ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *Biometals*.
- Gröneweg, J., Sellner, B. & Tappe, W.** (1994) Ammonia oxidation in *Nitrosomonas* at  $\text{NH}_3$  concentrations near  $K_m$ : effects of pH and temperature. *Water Res.* **28**, 2561-2566.
- Güven, D. & Schmidt, I.** (2009) Specific activity and viability of *Nitrosomonas europaea* during discontinuous and continuous fermentation. *Process Biochemistry* **44**, 516-520.

- Hakemian, A. S., Kondapalli, K. C., Telser, J., Hoffman, B. M., Stemmler, T. L. & Rosenzweig, A. C.** (2008) The metal centers of particulate methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochemistry* **47**, 6793-6801.
- Harms, H., Koops, H.-P. & Wehrmann, H.** (1976) An ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosovibrio tenuis* nov.gen.nov.sp. *Arch. Microbiol.* **108**, 105-111.
- Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J. & Saunders, J. R.** (1993) The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J Gen Microbiol* **139**, 1147-1153.
- Hendrich, M. P., Upadhyay, A. K., Riga, J., Arciero, D. M. & Hooper, A. B.** (2002) Spectroscopic characterization of the NO adduct of hydroxylamine oxidoreductase. *Biochemistry* **41**, 4603-4611.
- Hetzelt, H., Gilch, S., Meyer, O. & Schmidt, I.** (eingereicht) Hydroxylamine disproportion by soluble ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.*
- Hollocher, T. C., Tate, M. E. & Nicholas, D. J. D.** (1981) Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*. Definitive <sup>18</sup>O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **256**, 10834-10836.
- Hommes, N. G., Sayavedra-Soto, L. A. & Arp, D. J.** (1996) Mutagenesis of hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea* by transformation and recombination. *J. Bacteriol.* **178**, 3710-3714.
- Hommes, N. G., Sayavedra-Soto, L. A. & Arp, D. J.** (1998) Mutagenesis and expression of *amo*, which codes for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **180**, 3353-3359.
- Hommes, N. G., Sayavedra-Soto, L. A. & Arp, D. J.** (2001) Transcript analysis of multiple copies of *amo* (encoding ammonia monooxygenase) and *hao* (encoding hydroxylamine oxidoreductase) in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **183**, 1096-1100.



- Hommes, N. G., Sayavedra-Soto, L. A. & Arp, D. J.** (2003) Chemolithoorganotrophic growth of *Nitrosomonas europaea* on fructose. *J. Bacteriol.* **185**, 6809-6814.
- Hooper, A. B.** (1969) Biochemical basis of obligate autotrophy in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **97**, 776-779.
- Hooper, A. B.** (1989) Biochemistry of the nitrifying lithoautotrophic bacteria. pp. 239-265. In H.G. Schlegel & B. Bowien (Hrsg.), Autotrophic bacteria. Science Tech., Madison, Wisconsin, USA.
- Hooper, A. B., Arciero, D. M., Bergmann, D. & Hendrich, M. P.** (2005) The oxidation of ammonia as an energy source in bacteria in respiration. pp. 121-147. In D. Zannoni (Hrsg.), Respiration in archaea and bacteria: Diversity of procaryotic respiratory systems, Vol. 2. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Hooper, A. B. & Balny, C.** (1982) Reaction of oxygen with hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas*: Fast kinetics. *FEBS Lett.* **144**, 299-303.
- Hooper, A. B. & DiSpirito, A. A.** (1985) In bacteria which grow on simple reductants generation of a proton gradient involves extracytoplasmic oxidation of substrate. *Microbiol. Rev.* **49**, 140-157.
- Hooper, A. B., DiSpirito, A. A., Olson, T. C., Anderson, K. A., Cunningham, W. & Taaffe, L. R.** (1984) Generation of the proton gradient by a periplasmic dehydrogenase. pp. 53-58. In R. L. Crawford & R. S. Hanson (Hrsg.), Microbial growth on C<sub>1</sub>-compounds. Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., Columbia, USA.
- Hooper, A. B., Maxwell, P. C. & Terry, K. R.** (1978) Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea*: absorption spectra and content of heme and metal. *Biochemistry* **17**, 2984-2989.
- Hooper, A. B. & Nason, A.** (1965) Characterization of hydroxylamine-cytochrome *c* reductase from the chemoautotrophs *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosocystis oceanus*. *J. Biol. Chem.* **240**, 4044-4057.

- Hooper, A. B. & Terry, K. R.** (1973) Specific inhibitor of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.* **115**, 480-485.
- Hooper, A. B. & Terry, K. R.** (1974) Photoinactivation of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.* **119**, 899-906.
- Hooper, A. B. & Terry, K. R.** (1977) Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas*: inactivation by hydrogen-peroxide. *Biochemistry* **16**, 455-459.
- Hooper, A. B. & Terry, K. R.** (1979) Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas* – production of NO from hydroxylamine. *Biochim. Biophys. Acta* **571**, 12-20.
- Hooper, A. B., Vannelli, T., Bergmann, D. & Arciero, D. M.** (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*. **71**, 59-67.
- Hoppert, M., Mahony, T. J., Mayer, F. & Miller, D. J.** (1995) Quaternary structure of the hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **163**, 300-306.
- Huang, C. H. & Peng, J.** (2005) Evolutionary conservation and diversification of Rh family genes and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15512-15517.
- Hyman, M. R. & Arp, D. J.** (1992)  $^{14}\text{C}_2\text{H}_2$  and  $^{14}\text{CO}_2$ -labeling studies of the *de novo* synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **267**, 1534-1545.
- Hyman, M. R. & Arp, D. J.** (1993) An electrophoretic study of the thermal and reductant dependent aggregation of the 27 kDa component of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *Electrophoresis* **14**, 619-627.
- Hyman, M. R. & Arp, D. J.** (1995) Effects of ammonia on the *de novo* synthesis of polypeptides in cells of *Nitrosomonas europaea* denied ammonia as an energy source. *J. Biol. Chem.* **177**, 4974-4979.

- Hyman, M. R., Murton, I. B. & Arp, D. J.** (1988) Interaction of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* with alkanes, alkenes, and alkynes. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 3187-3190.
- Hyman, M. R., Page, C. L. & Arp, D. J.** (1994) Oxidation of methyl fluoride and dimethyl ether by ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Appl Environ Microbiol.* **60**, 3033-3035.
- Hyman, M. R. & Wood, P. M.** (1983) Methane oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. J.* **212**, 31-37.
- Hyman, M. R. & Wood, P. M.** (1984) Ethylene oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **137**, 155-158.
- Hyman, M. R. & Wood, P. M.** (1985) Suicidal inactivation and labelling of ammonia monooxygenase by acetylene. *Biochem. J.* **227**, 719-725.
- Hynes, R. K. & Knowles R.** (1978) Inhibition by acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **4**, 319-321.
- Igarashi, N., Moriyama, H., Fujiwara, T., Fukumori, Y. & Tanaka, N.** (1997) The 2.8 Å structure of hydroxylamine oxidoreductase from a nitrifying chemoautotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 276-284.
- Igarashi, N. & Tanaka, N.** (2001) Hydroxylamine oxidoreductase. pp. 454-470. In A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos & K. Wieghardt (Hrsg.), Handbook of metallo-proteins. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Javelle, A., Thomas, G., Marini, A. M., Kramer, R. & Merrick, M.** (2005) *In vivo* functional characterization of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. *Biochem. J.* **390**, 215-222.

- Jetten, M. S. M., Cirpus, I., Kartal, B., van Niftrik, L., van de Pas-Schoonen, K. T., Slikers, O., Haaijer, S., van der Star, W., Schmid, M., van de Vossenberg, J., Schmidt, I., Harhangi, H., van Loosdrecht, M., Kuenen, J. G., Op den Camp, H. & Strous, M. (2005)** 1994-2004: 10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 119-123.
- Jetten, M. S. M., Slikers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., van Niftrik, L., Cirpus, I., van de Pas-Schoonen, K., Lavik, G., Thamdrup, B., Le Paslier, D., Op den Camp, H. J., Hulth, S., Nielsen, L. P., Abma, W., Third, K., Engström, P., Kuenen, J. G., Jørgensen, B. B., Canfield, D. E., Sinninghe Damsté, J. S., Revsbech, N. P., Fuerst, J., Weissenbach, J., Wagner, M., Schmidt, I., Schmid, M. & Strous, M. (2003)** Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 107-114.
- Jetten, M. S. M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K. T., Schalk, J., van Dongen, U. G., van de Graaf, A. A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M. C. & Kuenen, J. G. (1998)** The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 421-437.
- Jetten, M. S. M., Wagner, M., Fuerst, J., van Loosdrecht, M. C., Kuenen, J. G. & Strous, M. (2001)** Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 283-288.
- Jones, R. D. & Morita, R. Y. (1983a)** Carbon monoxide oxidation by hemolithotrophic ammonium oxidizers. *Can. J. Microbiol.* **29**, 1545-1551.
- Jones, R. D. & Morita, R. Y. (1983b)** Methane oxidation by *Nitrosococcus oceanus* and *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 401-410.
- Jones, R. D. & Morita, R. Y. (1985)** Survival of a marine ammonium oxidizer under energy-source deprivation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **26**, 175-179.

- Jones, R. D., Morita, R. Y., Koops, H.-P. & Watson, S. W.** (1988) A new marine ammonium-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas cryotolerans* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **34**, 1122-1128.
- Juliette, L. Y., Hyman, M. R. & Arp, D. J.** (1993) Mechanism-based inactivation of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by allylsulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3728-3735.
- Juliette, L. Y., Hyman, M. R. & Arp, D. J.** (1995) Roles of bovine serum albumin and copper in the assay and stability of ammonia monooxygenase activity *in vitro*. *J. Bacteriol.* **177**, 4908-4913.
- Keen, G. A. & Prosser J. I.** (1987) Steady state and transient growth of autotrophic nitrifying bacteria. *Arch Microbiol* **147**, 73- 79.
- Keener, W. K. & Arp, D. J.** (1994) Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1914-1920.
- Kim, J. & Rees, D. C.** (1994) Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry.* **33**, 389-397.
- Kimura, H. & Futai, M.** (1978) Effects of phospholipids on L-lactate dehydrogenase from membranes of *Escherichia coli*. Activation and stabilization of the enzyme with phospholipids. *J. Biol. Chem.* **253**, 1095-1110.
- Kleiner, D.** (1981) The transport of  $\text{NH}_3$  and  $\text{NH}_4^+$  across biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **639**, 41-52.
- Klotz, M. G., Alzerreca, J. & Norton, J. M.** (1997) A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the *amo* operon? *FEMS Microbiol. Lett.* **150**, 65-73.

- Klotz, M. G. & Norton, J. M.** (1998) Multiple copies of ammonia monooxygenase (*amo*) operons have evolved under biased AT/GC mutational pressure in ammonia-oxidizing autotrophic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **168**, 303-311.
- Klotz, M. G., Schmid, M. C., Strous, M., op den Camp, H. J., Jetten, M. S. M. & Hooper, A. B.** (2008) Evolution of an octahaem cytochrome *c* protein family that is key to aerobic and anaerobic ammonia oxidation by bacteria. *Environ. Microbiol.* **10**, 3150-3163.
- Klotz, M. G. & Stein, L. Y.** (2008) Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**, 146-156.
- Koops, H.-P., Böttcher, B., Möller, U. C., Pommerening-Röser, A. & Stehr, G.** (1990) Description of a new species of *Nitrosococcus*. *Arch. Microbiol.* **154**, 244-248.
- Koops, H.-P., Böttcher, B., Möller, U. C., Pommerening-Röser, A. & Stehr, G.** (1991) Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1689-1699.
- Koops, H.-P., Harms, H. & Wehrmann, H.** (1976) Isolation of a moderate halophilic ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosococcus mobilis* nov. sp. *Arch. Microbiol.* **107**, 277-282.
- Koops, H.-P. & Möller, U. C.** (1992) The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria. pp. 2625-2637. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer (Hrsg.), The prokaryotes, Vol. 3. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Kowalchuk, G. A. & Stephen, J. R.** (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 485-529.

- Kumar, S. & Nicholas, D. J.** (1983) Proton electrochemical gradients in washed cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *J. Bacteriol.* **154**, 65-71.
- Lees, H.** (1946) Effect of copper-enzyme poisons on soil nitrification. *Nature* **158**, 97.
- Lees, H.** (1952) The biochemistry of the nitrifying organisms. I. The ammonia oxidizing system of *Nitrosomonas*. *Biochem. J.* **52**, 134-139.
- Lemberg, R. & Barrett, J.** (1973) Bacterial cytochromes and cytochromes oxidases. pp. 217-326. In: R. Barrett & J. Lemberg (Hrsg.), *Cytochromes*. Academic Press, London, United Kingdom.
- Lerch, K., Huber, M., Schneider, H.-J., Drexel, R. & Linzen, B.** (1986) Different origins in the metal binding site in binuclear copper proteins, tyrosinase and hemocyanin. *J. Inorg. Biochem.* **26**, 213-217.
- Lieberman, R. L. & Rosenzweig, A. C.** (2005) Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* **434**, 177-182.
- Lieberman, R. L., Shrestha, D. B., Doan, P. E., Hoffman, B. M., Stemmler, T. L. & Rosenzweig, A. C.** (2003) Purified particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a dimer with both mononuclear copper and a copper-containing cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 3820-2825.
- Logan, M. S. P. & Hooper, A. B.** (1995) Suicide inactivation of hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas europaea* by organohydrazines. *Biochemistry* **34**, 9257-9264.
- Londesborough, J.** (1980) The cause of sharply bent or discontinuous Arrhenius plots for enzyme-catalysed reactions. *Eur. J. Biochem.* **105**, 211-215.
- Loveless, J. E. & Painter, H. A.** (1968) The influence of metal ion concentrations and pH value on the growth of a *Nitrosomonas* strain isolated from activated sludge. *J. Gen. Microbiol.* **52**, 1-14.

- Ludewig, U.** (2004) Electroneutral ammonium transport by basolateral Rhesus B glycoprotein. *J. Physiol.* **559**, 751-759.
- MacDonald, R. M.** (1986) Nitrification in soil: an introductory history. pp. 1-16. *In*: J. I. Prosser (Hrsg.), Nitrification, Vol. 20. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- Mak, D. O., Dang, B., Weiner, I. D., Foskett, J. K. & Westhoff, C. M.** (2006) Characterization of ammonia transport by the kidney Rh glycoproteins, RhBG and RhCG. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **290**, 297-305.
- Maneg, O., Malatesta, F., Ludwig, B. & Drosou, V.** (2004) Interaction of cytochrome *c* with cytochrome oxidase: two different docking scenarios. *Biochim. Biophys. Acta* **1655**, 274-281.
- Mansch, R. & Bock, E.** (1998) Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria. *Biodegradation* **9**, 47-64.
- Marini, A. M., Matassi, G., Raynal, V., André, B., Cartron, J. P. & Cherif-Zahar, B.** (2000) The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat. Genet.* **26**, 341-344.
- Martinho, M., Choi, D. W., DiSpirito, A. A., Antholine, W. E., Semrau, J. D. & Münck, E.** (2007) Mössbauer studies of the membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath): Evidence for a diiron center. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15783-15785.
- Martiny, H. & Koops, H.-P.** (1982) Incorporation of organic compounds into cell protein by lithotrophic, ammonia-oxidizing bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* **48**, 327-336.
- Mayer, M. & Ludewig, U.** (2006) Role of AMT1;1 in  $\text{NH}_4^+$ -acquisition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* **8**, 522-528.



- Mayer, M., Schaaf, G., Mouro, I., Lopez, C., Colin, Y., Neumann, P., Cartron, J. P. & Ludewig, U.** (2006) Different transport mechanisms in plant and human AMT/Rh-type ammonium transporters. *J. Gen. Physiol.* **127**, 133–144.
- McTavish, H., Fuchs, J. A. & Hooper, A. B.** (1993a) Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **175**, 2436-2444.
- McTavish, H., LaQuier, F., Arciero, D., Logan, M., Mundfrom, G., Fuchs, J. A. & Hooper, A. B.** (1993b) Multiple copies of genes coding for electron transport proteins in the bacterium *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **175**, 2445-2447.
- Miller, D. J. & Wood, P. M.** (1982) Characterization of the *c*-type cytochromes of *Nitrosomonas europaea* with the aid of fluorescent gels. *Biochem. J.* **207**, 511-517.
- Miller, D. J. & Wood, P. M.** (1983) The soluble cytochrome oxidase of *Nitrosomonas europaea*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1645-1650.
- Miller, L. G., Coutlakis, M. D., Oremland, R. S. & Ward, B. B.** (1993) Selective inhibition of ammonium oxidation and nitrification-linked N<sub>2</sub>O formation by methyl fluoride and dimethyl ether. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2457-2464.
- Mota, C., Ridenoure, J., Cheng, J. & de Los Reyes, F. L.** (2005) High levels of nitrifying bacteria in intermittently aerated reactors treating high ammonia wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**, 391-400.
- Müller, C., Sherlock, R. R. & Williams, P. H.** (1998) Field method to determine N<sub>2</sub>O emission from nitrification and denitrification. *Biol. Fertil. Soils* **28**, 51-55.
- Nguyen, H.-H. T., Elliott, S. J., Yip, J. H. & Chan, S. I.** (1998) The particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a novel copper-containing three-subunit enzyme. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **273**, 7957-7966.

- Nguyen, H.-H. T., Nakagawa, K. H., Hedman, B., Elliott, S. J., Lidstrom, M. E., Hodgeson, K. O. & Chan, S. I.** (1996) X-ray absorption and EPR studies on the copper ions associated with the particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12766-12776.
- Nguyen, H.-H. T., Schiemke, A. K., Jacobs, S. J., Hales, B. J., Lidstrom, M. E. & Chan, S. I.** (1994) The nature of the copper ions in the membranes containing the particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Biol. Chem.* **269**, 14995-15005.
- Nicholas, D. J. & Rao, P. S.** (1964) The incorporation of labelled CO<sub>2</sub> into cells and extracts of *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 397-406.
- Nielsen, A. K., Gerdes, K. & Murrell, J. C.** (1997) Copper-dependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium*. *Mol. Microbiol.* **25**, 399-409.
- Nielsen, H. & Krogh, A.** (1998) Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **6**, 122-130.
- Norton, J. M., Low, J. M. & Klotz, M. G.** (1996) The gene encoding ammonia monooxygenase subunit A exists in three identical copies in *Nitrosospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**, 181-188.
- Olson, T. C. & Hooper, A. B.** (1983) Energy coupling in the bacterial oxidation of small molecules: an extracytoplasmic dehydrogenase in *Nitrosomonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* **19**, 47-50.
- op den Camp, H. J., Kartal, B., Güven, D., van Niftrik, L. A., Haaijer, S. C., van der Star, W. R., van de Pas-Schoonen, K. T., Cabezas, A., Ying, Z., Schmid, M. C., Kuypers, M. M., van de Vossenberg, J., Harhangi, H. R., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M. C., Kuenen, J. G., Strous, M. & Jetten, M. S. M.** (2006) Global impact and application of the anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 174-178.

- Painter, H. A.** (1986) Nitrification in the treatment of sewage and waste-water. pp. 185-211. In J. I. Prosser (Hrsg.), Nitrification. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- Pommerening-Röser, A., Rath, G. & Koops, H.-P.** (1996) Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*. *System. Appl. Microbiol.* **19**, 344-351.
- Poth, M. & Focht, D. D.** (1985)  $^{15}\text{N}$  kinetic analysis of  $\text{N}_2\text{O}$  production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1134-1141.
- Poughon, L., Dussap, C.-G. & Gros, J.-B.** (2001) Energy model and metabolic flux analysis for autotrophic nitrifiers. *Biotechnol. Bioeng.* **72**, 416-433.
- Prior, S. D. & Dalton, H.** (1985) The effect of copper ions on membrane content and methane monooxygenase activity in methanol-grown cells of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Gen. Microbiol.* **131**, 155-163.
- Prosser, J. I.** (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. pp. 125-181. In A. H. Rose & D. W. Tempest (Hrsg.), Advances in microbial physiology, Vol. 30. Academic Press, London, United Kingdom.
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H.-P. & Wagner, M.** (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5368-5382.
- Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Röser, A. & Koops, H.-P.** (2003) 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1485-1494.
- Radniecki, T. S. & Ely, R. L.** (2008) Zinc chloride inhibition of *Nitrosococcus mobilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 1085-1095.

- Radniecki, T. S., Semprini, L. & Dolan, M. E.** (2009) Expression of *merA*, *amoA* and *hao* in continuously cultured *Nitrosomonas europaea* cells exposed to zinc chloride additions. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 546-553.
- Rasche, M. E., Hyman, M. R. & Arp, D. J.** (1991) Factors limiting aliphatic chlorocarbon degradation by *Nitrosomonas europaea* cometabolic inactivation of ammonia monooxygenase and substrate specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2986-2994.
- Reber, H.** (1974) Regulation of amino acid and glucose dissimilation in so-called ammonifiers and in other soil microorganisms. *Arch. Microbiol.* **101**, 247-258.
- Rees, M. & Nason, A.** (1966) Incorporation of atmospheric oxygen into nitrite formed during ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Acta.* **113**, 398-401.
- Richardson, D. J. & Watmough, N. J.** (1999) Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 207-219.
- Robertson, L. A. & Künen, J. G.** (1990) Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* **57**, 139-152.
- Rosenzweig, A. C.** (2008) The metal centres of particulate methane mono-oxygenase. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1134-1137.
- Rotthauwe, J. H., de Boer, W. & Liesack, W.** (1995) Comparative analysis of gene sequences encoding ammonia monooxygenase of *Nitrospira* sp. AHB1 and *Nitrosolobus multiformis* C-71. *FEMS Microbiol. Lett.* **133**, 131-135.
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P. & Liesack, W.** (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4704-4712.

- Sayavedra-Soto, L. A., Hommes, N. G., Alzerreca, J. J., Arp, D. J., Norton, J. M. & Klotz, M. G.** (1998) Transcription of the *amoC*, *amoA* and *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**, 81-88.
- Schmidt, I.** (1997) Anaerobe Ammoniakoxidation von *Nitrosomonas eutropha*. (Anaerobic ammonia oxidation of *Nitrosomonas eutropha*). Doctoral Thesis, University of Hamburg.
- Schmidt, I. & Bock, E.** (1997) Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Arch. Microbiol.* **167**, 106-111.
- Schmidt, I. & Bock, E.** (1998) Anaerobic ammonia oxidation by cell-free extracts of *Nitrosomonas eutropha*. *Antonie Leeuwenhoek.* **73**, 271-278.
- Schmidt, I., Bock, E. & Jetten, M. S. M.** (2001a) Ammonia oxidation by *Nitrosomonas eutropha* with NO<sub>2</sub> as oxidant is not inhibited by acetylene. *Microbiology* **147**, 2247-2253.
- Schmidt, I., Zart, D. & Bock, E.** (2001b) Effects of gaseous NO<sub>2</sub> on cells of *Nitrosomonas eutropha* previously incapable of using ammonia as an energy source. *Antonie Leeuwenhoek* **79**, 39-47.
- Schmidt, I., Zart, D. & Bock, E.** (2001c) Gaseous NO<sub>2</sub> as a regulator for ammonia oxidation of *Nitrosomonas eutropha*. *Antonie Leeuwenhoek* **79**, 311-318.
- Schmidt, I., Hermelink, C., van de Pas-Schoonen, K., Strous, M., op den Camp, H. J., Kuenen, J. G. & Jetten, M. S. M.** (2002a) Anaerobic ammonia oxidation in the presence of nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>) by two different lithotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5351-5357.
- Schmidt, I., Strous, M. & Jetten, M. S. M.** (2002b) Activated sludge – microbiology of nitrogen removal. pp. 113-130. In G. Bitton (Hrsg.), Encyclopedia of environmental microbiology. Jon Wiley & Sons, New York, USA.

- Schmidt, I. & Jetten, M. S. M.** (2004) Anaerobic oxidation of inorganic nitrogen compounds. pp. 283-303. *In* M. M. Nakano & P. Zuber (Hrsg.), Strict and facultative anaerobes: medical and environmental aspects. Horizon Scientific Press. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Schmidt, I., Look, C., Bock, E. & Jetten, M. S. M.** (2004a) Ammonium and hydroxylamine uptake and accumulation in *Nitrosomonas*. *Microbiology* **150**, 1405-1412.
- Schmidt, I., Steenbakkers, P. J. M., op den Camp, H. J. M., Schmidt, K. & Jetten, M. S. M.** (2004b) Physiologic and proteomic evidence for a role of nitric oxide in biofilm formation by *Nitrosomonas europaea* and other ammonia oxidizers. *J. Bacteriol.* **186**, 2781-2788.
- Schmidt, I., van Spanning, R. J. M. & Jetten, M. S. M.** (2004c) Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and NirK- and NorB-deficient mutants. *Microbiology* **150**, 4107-4114.
- Schrock, H. L. & Gennis, R. B.** (1977) High affinity lipid binding sites on the peripheral membrane enzyme pyruvate oxidase. Specific ligand effects on detergent binding. *J. Biol. Chem.* **252**, 5990-5995.
- Schuster, M. & Conrad, R.** (1992) Metabolism of nitric-oxide and nitrous oxide during nitrification and denitrification in soil at different incubation conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **101**, 133-143.
- Semrau, J. D., Chistoserdov, A., Lebron, J., Costello, A., Davagnino, J. & Kenna, E.** (1995) Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. *J. Bacteriol.* **177**, 3071-3079.
- Shears, J. H. & Wood, P. M.** (1985) Spectroscopic evidence for a photosensitive oxygenated state of ammonia mono-oxygenase. *Biochem. J.* **226**, 499-507.

- Shears, J. H. & Wood, P. M.** (1986) Tri- and tetramethylhydroquinone as electron donors for ammonia monooxygenase in whole cells of *Nitrosomonas europaea* *FEMS Microbiol. Lett.* **33**, 281-284.
- Shiemke, A. K., Arp, D. J. & Sayavedra-Soto, L. A.** (2004) Inhibition of membranebound methane monooxygenase and ammonia monooxygenase by diphenyliodonium: implications for electron transfer. *J. Bacteriol.* **186**, 928-937.
- Shrestha, N. K., Hadano, S., Kamachi, T. & Okura, I.** (2001) Conversion of ammonia to dinitrogen in wastewater by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Biochem. Biotech.* **90**, 221-232.
- Shrestha, N. K., Hadano, S., Kamachi, T. & Okura, I.** (2002) Dinitrogen production from ammonia by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Catal.* **237**, 33-39.
- Siewe, R. M., Weil, B., Burkovski, A., Eikmanns, B. J., Eikmanns, M. & Kramer, R.** (1996) Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **271**, 5398–5403.
- Sorokin, D., Tourova, T., Schmid, M., Wagner, M., Koops, H.-P., Kuenen, J. G. & Jetten, M. S. M.** (2001) Isolation and properties of obligately chemolithotrophic and extremely alkali-tolerant ammonia-oxidizing bacteria from Mongolian soda lakes. *Arch. Microbiol.* **176**, 170-177.
- Stein, L. Y., Arp, D. J. & Hyman, M. R.** (1997) Regulation of the synthesis and activity of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by altering pH to affect NH<sub>3</sub> availability. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4588-4592.
- Stein, L. Y., Sayavedra-Soto, L. A., Hommes, N. G. & Arp, D.J.** (2000) Differential regulation of *amoA* and *amoB* gene copies in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**, 163-168.
- Stewart, W. D.** (1969) Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free-living micro-organisms. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **172**, 367-388.

- Stirling, D. I. & Dalton, H.** (1977) Effect of metal-binding agents and other compounds on methane oxidation by two strains of *Methylococcus capsulatus*. *Arch. Microbiol.* **114**, 71-76.
- Strous, M., Kuenen, J. G. & Jetten, M. S. M.** (1999) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3248-3250.
- Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M. W., Horn, M., Daims, H., Bartol-Mavel, D., Wincker, P., Barbe, V., Fonknechten, N., Vallenet, D., Segurens, B., Schenowitz-Truong, C., Médigue, C., Collingro, A., Snel, B., Dutilh, B. E., op den Camp, H. J., van der Drift, C., Cirpus, I., van de Pas-Schoonen, K. T., Harhangi, H. R., van Niftrik, L., Schmid, M., Keltjens, J., van de Vossenberg, J., Kartal, B., Meier, H., Frishman, D., Huynen, M. A., Mewes, H. W., Weissenbach, J., Jetten, M. S. M., Wagner, M. & Le Paslier, D.** (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* **440**, 790-794.
- Stüven, R. & Bock, E.** (2001) Nitrification and denitrification as a source for NO and NO<sub>2</sub> production in high-strength wastewater. *Water Res.* **35**, 1905-14.
- Stüven, R., Vollmer, M. & Bock, E.** (1992) The impact of organic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **158**, 439-443.
- Suzuki, I., Dular, U. & Kwok, S.-C.** (1974) Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J. Bacteriol.* **120**, 556-558.
- Suzuki, I. & Kwok, S.-C.** (1969) Oxidation of ammonia by spheroplasts of *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **99**, 897-898.
- Suzuki, I. & Kwok, S.-C.** (1970) Cell-free ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* extracts: Effects of polyamines, Mg<sup>2+</sup> and albumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39**, 950-955.



- Suzuki, I., Kwok, S.-C., Dular, U. & Tsang, D. C. Y.** (1981) Cell-free ammonia-oxidizing system of *Nitrosomonas europaea*: general conditions and properties. *Can. J. Biochem.* **59**, 477-483.
- Takeguchi, M. & Okura, I.** (2000) Role of iron and copper in particulate methane monooxygenase of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Catal. Surv.* **4**, 51-63.
- Tarre, S. & Green, M.** (2004) High-rate nitrification at low pH in suspended- and attached-biomass reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6481-6487.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L., Burton, F. & Stensel, H. D.** (2002) Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. McGraw-Hill Science Engineering.
- Teske, A., Alm, E., Regan, J. M., Toze, S., Rittmann, B. E. & Stahl, D. A.** (1994) Evolutionary relationship among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.* **176**, 6623-6630.
- Tsang, D. C. Y. & Suzuki, I.** (1982) Cytochrome *c*<sub>554</sub> as a possible electron donor in the hydroxylation of ammonia and carbon monoxide in *Nitrosomonas europaea*. *Can. J. Biochem.* **60**, 1018-1024.
- Tumanova, L. V., Tukhvatullin, I. A., Burbaev, D. S., Gvozdev, R. I. & Andersson, K. K.** (2008) The binuclear iron site of membrane-bound methane hydroxylase from *Methylococcus capsulatus* (strain M). *Bioorg. Khim.* **34**, 194-203.
- Uemoto, H. & Saiki, H.** (2000) Nitrogen removal reactor using packed gel envelopes containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*. *Biotechnol. Bioeng.* **67**, 80-86.
- Utaker, J. B., Andersen, K., Aakra, A., Moen, B. & Nes, I. F.** (2002) Phylogeny and functional expression of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the autotrophic ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospira* sp. isolate 40KI. *J. Bacteriol.* **184**, 468-478.

- Vitousek, P. M., Hättenschwiler, S., Olander, L. & Allison, S.** (2002) Nitrogen and Nature. *Ambio*. **31**, 97-101.
- Voysey, P. A. & Wood, P. M.** (1987) Methanol and formaldehyde oxidation by an autotrophic nitrifying bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **33**, 283-290.
- Watson, S. W.** (1965) Characteristics of a marine nitrifying bacterium, *Nitrosocystis oceanus* sp. n. *Limnol. Oceanogr.* **10**, 274-289.
- Watson, S. W.** (1971) Re-isolation of *Nitrospira briensis* S. Winogradsky and H. Winogradsky. pp. 450-456. In A. D. Buchanan & N. E. Gibbson (Hrsg.), Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
- Watson, S. W., Bock, E., Harms, H., Koops, H.-P. & Hooper, A. B.** (1989) Nitrifying bacteria. pp. 1822-1834. In J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig & J. G. Holt (Hrsg.), Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
- Watson, S. W., Graham, L. B., Remsen, C. C. & Valois, F. W.** (1971) A lobular, ammonia-oxidizing bacterium. *Nitrosolobus multiformis* nov. gen. nov. sp. *Arch. Microbiol.* **76**, 183-203.
- Watson, S. W. & Mandel, M.** (1971) Comparison of the morphology and deoxyribonucleic acid composition of 27 strains of nitrifying bacteria. *J. Bacteriol.* **107**, 563-569.
- Watson, S. W. & Remsen, C. C.** (1969) Macromolecular subunits in the walls of marine nitrifying bacteria. *Science* **163**, 685-686.
- Watson, S. W. & Remsen, C. C.** (1970) Cell envelope of *Nitrosocystis oceanus*. *J. Ultrastruct. Res.* **33**, 148-160.
- Watson, S. W., Valois, F. W. & Waterbury, J. B.** (1981) The family *Nitrobacteraceae*, pp. 1005-1022. In M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows & H. G. Schlegel (Hrsg.), The prokaryotes, Vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

- Wei, X., Sayavedra-Soto, L.A. & Arp, D. J.** (2004) The transcription of the *cbb* operon in *Nitrosomonas europaea*. *Microbiology* **150**, 1869-1879.
- Weidinger, K., Neuhäuser, B., Gilch, S., Ludewig, U., Meyer, O. & Schmidt, I.** (2007) Functional and physiological evidence for a Rhesus-type ammonia transporter in *N. europaea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **273**, 260-267.
- Westhoff, C. M., Ferreri-Jacobia, M., Mak, D. O. & Foscett, J. K.** (2002) Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter. *J Biol Chem* **277**, 12499–12502.
- Whittaker, M., Bergmann, D., Arciero, D. & Hooper, A. B.** (2000) Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 346-355.
- Wickner, W.** (1979) The assembly of proteins into biological membranes: The membrane trigger hypothesis. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 23-45.
- Wilce, M. C. J., Dooley, D. M., Freeman, H. C., Guss, J. M., Matsunami, H., McIntire, W. S., Ruggiero, C. E., Tanizawa, K. & Yamaguchi, H.** (1997) Crystal structures of the copper-containing amine oxidase from *Arthrobacter globiformis* in the holo and apo forms: implications for the biogenesis of topaquine. *Biochemistry* **36**, 16116-16133.
- Wilhelm, R., Abeliovich, A. & Nejidat, A.** (1998) Effect of long-term ammonia starvation on the oxidation of ammonia and hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*. *J. Biochem.* **124**, 811-815.
- Wilson, K., Sprent, J. I. & Hopkins, D. W.** (1997) Nitrification in aquatic soils. *Nature* **385**, 404.
- Winogradsky, S.** (1890) 2nd memoire. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann. Inst. Past.* **4**, 257-275.
- Winogradsky, S.** (1982) Contributions a la morphologie des organismes de la nitrification. *Arch. Scien Biol.* **1**, 86-137.

- Woese, C. R., Weisburg, W. G., Hahn, C. M., Paster, B. J., Zablen, L. B., Lewis, B. J., Macke, T. J., Ludwig, W. & Stackebrandt, E.** (1985) The phylogeny of the purple bacteria: the gamma subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**, 25–33.
- Woese, C. R., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Hahn, C. M., Tanner, R. S., Krieg, N. R., Koops, H.-P., Harms, H. & Stackebrandt, E.** (1984) The phylogeny of the purple bacteria: the beta subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**, 327–336.
- Wood, P. M.** (1988) Monooxygenase and free radical mechanisms for biological ammonia oxidation. pp. 217–243. In J. A. Cole & S. Ferguson (Hrsg.), The nitrogen and sulfur cycles. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Wullenweber, M., Koops, H.-P. & Martiny, H.** (1978) Der Einfluß von Nitrit auf den Verlauf des Wachstums von *Nitrosomonas* Stamm Nm1. *Mitt. Inst. Allg. Bot.* **16**, 159–164.
- Yamanaka, T. & Shinra, M.** (1974) Cytochrome *c*-552 and cytochrome *c*-554 derived from *Nitrosomonas europaea*. Purification, properties, and their function in hydroxylamine oxidation. *J. Biochem.* **75**, 1265–1273.
- Yu, S. S., Chen, K. H., Tseng, M. Y., Wang, Y. S., Tseng, C. F., Chen, Y. J., Huang, D. S. & Chan, S. I.** (2003) Production of high-quality particulate methane monooxygenase in high yields from *Methylococcus capsulatus* (bath) with a hollow-fiber membrane bioreactor. *J. Bacteriol.* **185**, 5915–24.
- Yuan, H., Collins, M. L. & Antholine, W. E.** (1998) Concentration of Cu, EPR-detectable Cu, and formation of cupric-ferrocyanide in membranes with pMMO. *J. Inorg. Biochem.* **72**, 179–185.
- Yuan, H., Collins, M. L. & Antholine, W. E.** (1999) Type 2 Cu<sup>2+</sup> in pMMO from *Methylobacterium album* BG8. *Biophys. J.* **76**, 2223–2239.
- Zahn, J. A., Arciero, D. M., Hooper, A. B. & DiSpirito, A. A.** (1996) Evidence for an iron center in the ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Lett.* **397**, 35–38.

- Zahn, J. A. & DiSpirito, A. A.** (1996) Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Bacteriol.* **178**, 1018-1029.
- Zart, D.** (1997) Entwicklung eines Verfahrens zur Entfernung von Ammonium-Stickstoff mit Hilfe einer Reinkultur von *Nitrosomonas europaea*. (Development of a process for ammonia nitrogen elimination with a pure culture of *Nitrosomonas europaea*). Doctoral Thesis, University of Hamburg.
- Zart, D. & Bock, E.** (1998) High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO<sub>2</sub> or NO. *Arch. Microbiol.* **169**, 282-286.
- Zart, D., Schmidt, I. & Bock, E.** (2000) Significance of gaseous NO for ammonia oxidation by *Nitrosomonas eutropha*. *Antonie Leeuwenhoek* **77**, 49-55.
- Zhu, G., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q. & Wang, S.** (2008) Biological removal of nitrogen from wastewater. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **192**, 159-195.
- Zumft, W. G.** (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 533-616.



## **Publikationen**





# I

A soluble form of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*

**Stefan Gilch, Ortwin Meyer & Ingo Schmidt\***

*Biological Chemistry*, published online 20.05.2009

(DOI: 10.1515/BC.2009.085)

Department of Microbiology, University of Bayreuth, 95447 Bayreuth, Germany

\*Corresponding author.

Tel.: +49 921 552714; fax: +49 921 552727;

E-mail: ingo.schmidt1@uni-bayreuth.de

## **Darstellung des Eigenanteils:**

Alle Experimente, mit Ausnahme der Maldi-Tof-Analysen der Untereinheiten der löslichen AMO, sowie der Metallbestimmung durch ICP-MS wurden von mir durchgeführt und ausgewertet. Alle aufgeführten Abbildungen sind Resultate meiner Arbeit. Der Eigenanteil beläuft sich auf ca. 90 %.

Verfasst wurde diese Publikation von Dr. Ingo Schmidt, Prof. Dr. Ortwin Meyer und mir.

## Abstract

Ammonia monooxygenase (AMO) of *Nitrosomonas europaea* is a metalloenzyme that catalyzes the oxidation of ammonia to hydroxylamine. This study shows that AMO resides in the cytoplasm of the bacteria in addition to its location in the membrane and is distributed about equally in both subcellular fractions. AMO in both fractions catalyzes the oxidation of ammonia and binds [ $^{14}\text{C}$ ]acetylene, a mechanism-based inhibitor that specifically interacts with catalytically active AMO. Soluble AMO was purified 12-fold to electrophoretic homogeneity with a yield of 8%. AMO has a molecular mass of ~283 kDa with subunits of ~27 kDa ( $\alpha$ -subunit, AmoA), ~42 kDa ( $\beta$ -subunit, AmoB), and ~24 kDa ( $\gamma$ -subunit, cytochrome  $c_1$ ) in an  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$  subunit structure. Different from  $\beta$ -subunit of membrane-bound AMO, AmoB of soluble AMO possesses an N-terminal signal sequence. AMO contains Cu ( $9.4 \pm 0.6$  mol [mol AMO] $^{-1}$ ), Fe ( $3.9 \pm 0.3$  mol [mol AMO] $^{-1}$ ), and Zn (0.5 to 2.6 mol [mol AMO] $^{-1}$ ). Upon reduction the visible absorption spectrum of AMO reveals absorption bands characteristic of cytochrome  $c$ . Electron paramagnetic resonance spectroscopy of air-oxidized AMO at 50 K shows a paramagnetic signal originating from  $\text{Cu}^{2+}$  and at 10 K a paramagnetic signal characteristic of heme-Fe.

**Keywords:** Acetylene; AmoA, AmoB, cytochrome  $c_1$ ; cooper and iron enzyme; N-terminal signal sequence; purification

## Introduction

*N. europaea* is a Gram-negative bacterium that can utilize ammonia as a sole source of energy under chemolithoautotrophic growth conditions. Ammonia oxidation is mediated by ammonia monooxygenase (AMO), an enzyme which oxidizes ammonia to hydroxylamine (Hooper et al., 1997; Arp et al., 2002; Rees and Nason, 1966). A purified AMO is not yet available. Therefore, the current understanding of AMO relies on biochemical studies on intact bacteria or subcellular fractions, genomic data, and analogies to membrane-bound methane monooxygenase (pMMO) (Wood, 1986; Zahn et al., 1996; Hooper et al., 1997; Schmidt and Jetten, 2004). After cell rupture of *N. europaea* ammonia oxidation activity is significantly reduced, but the presence of ammonia oxidation activities in membrane as well as soluble

fractions of *N. europaea* was reported (Suzuki and Kwok, 1970; Juliette et al., 1995; Schmidt and Bock, 1998).

Two similar copies of the *amo*-operon (*amoCAB*) and a single copy of *amoC* are encoded in the genome of *N. europaea* (McTavish et al., 1993; Chain et al., 2003). The two copies of *amoC* from the *amo*-operons differ from each other in 11 bp resulting in alteration of one amino acid at position 156 (methionine or valine). The two copies of *amoA* and *amoB* are identical (Sayavedra-Soto et al., 1998; Chain et al., 2003). The physiological significance of the two copies is still unknown. Mutagenesis of the different *amo* genes showed that a single copy of the *amo*-operon is sufficient to ensure growth of *N. europaea* (Hommes et al., 1998; Hommes et al., 2001). AmoA and AmoB, but not AmoC, were shown to form a complex and were identified as subunits of a heteromultimeric membrane-associated protein, and a signal peptide for the integration into the membrane was predicted for the AmoB subunit (Hyman and Wood, 1985; Hyman and Arp, 1993; McTavish et al., 1993; Hooper et al., 1997; Arp et al., 2002). For AmoC, a function as a chaperone was suggested (Klotz et al., 1997).

The AMO was considered as a Cu and possibly Fe containing enzyme (Ensign et al., 1993; Zahn et al., 1996). The lack of purified AMO precluded so far the direct analysis of metals in the enzyme and instead indirect evidence was used. Indications for Cu in AMO are, first, that Cu-chelating agents like thiourea inhibit and addition of  $\text{Cu}^{2+}$ -ions increases the ammonia oxidation activity (Loveless and Painter, 1968; Ensign et al., 1993). Second, the similarity between AMO and Cu-containing pMMO (Semrau et al., 1995; Hiep-Hoa et al., 1997; Nguyen et al., 1998; Basu et al., 2003; Lieberman and Rosenzweig, 2005) on functional and genetic level was taken as indication that AMO might be a Cu-containing protein as well (Hooper and Terry, 1973; Ensign et al., 1993; Zahn et al., 1996). Evidence for non-heme Fe in AMO was obtained from electron paramagnetic resonance (EPR) measurements of reduced membrane fractions of *N. europaea* exposed to nitric oxide (Zahn et al., 1996). More recently, evidence was provided for dinuclear Fe center(s) in pMMO of *Methylococcus capsulatus* (Martinho et al., 2007; Tumanova et al., 2008) and in analogy, AMO might also contain Fe.

Acetylene is an efficient suicide inhibitor of ammonia oxidation in *N. europaea* and acts only on catalytically active AMO (Hynes and Knowles, 1978; Hyman and Wood, 1985). Acetylene forms a covalent bond with the AmoA subunit which irreversibly inhibits ammonia oxidation by AMO (Hynes and Knowles, 1978; McTavish et al., 1993; Schmidt et al., 2001). It was suggested that inactivation of AMO results from an oxidation of acetylene (Hyman and Wood, 1985; Zahn et al., 1996). A ketene is generated and binds covalently to His 191 of

AmoA. His 191 is assumed to neighbor an active site of AMO (Gilch et al., 2009). Binding of acetylene in *N. europaea* is specific for AmoA of AMO and is not directed to other proteins (Hyman and Wood, 1985; Hyman and Arp, 1990; Schmidt et al., 2001; Gilch et al., 2009).

In the present study, we have identified AMO in the cytoplasm of *N. europaea*. Soluble AMO catalyzes the oxidation of ammonia and is inactivated and labeled by [<sup>14</sup>C]acetylene. We have established a protocol for the preparation of homogenous soluble AMO. The enzyme is a Cu- and Fe-containing heme protein with a molecular mass of ~283 kDa and an  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ -subunit structure.

## Results

### Subcellular distribution of AMO in *N. europaea*

Previous studies by Schmidt and Bock (1998) gave first evidence for the presence of AMO in the soluble fraction of *N. europaea*, in addition to the membrane-bound occurrence of the enzyme. To reinvestigate this aspect, intact cells of *N. europaea* and subcellular fractions were tested for AMO activity (Table 1).

Table 1

As is apparent from Table 1, ammonia oxidation activity of AMO is instantaneously decreased when the integrity of the bacterial cell is destroyed. In addition, AMO activity vanishes during the time required for preparation of soluble and membrane fraction. Considering the sum of total AMO activity in the soluble and membrane fraction ( $4.5 \mu\text{mol NH}_3 \text{ min}^{-1}$ ), 42% of the enzyme is soluble and 58% is membrane-bound (Table 1). This suggests that a considerable proportion of active AMO is present in a soluble conformation. Throughout this manuscript we use the term 'soluble AMO' for the soluble conformation and 'membrane-bound AMO' for the membrane-bound conformation of AMO. After cell rupture AMO activity constantly decreased and was completely lost after about 8 h. It was speculated, that a loss of Cu (Ensign et al., 1993), destruction of the active site upon exposure to high oxygen concentrations, or the absence of the physiological electron donor for AMO in subcellular fraction (Suzuki and Kwok, 1970) might cause the loss of activity. Addition of bovine serum albumin (up to  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ), spermine (2 mM), or  $\text{CuCl}_2$  (up to

0.5 mM) is appropriate to increase and stabilize *in vitro* activity (Suzuki and Kwok, 1970; Suzuki et al., 1981; Ensign et al., 1993; Juliette et al., 1995). These compounds could not be applied in this work, because they interfere with protein purification. Instead phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) was added as stabilizing agent (Juliette et al., 1995), but its effect on the AMO activity was not sufficient to maintain an active enzyme during purification. Fe was reported to be important for the activity of pMMO (Choi et al., 2003), but supplementing AMO containing subcellular fractions with up to 250  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> neither increased nor conserved AMO activity.

Acetylene binds irreversibly and selectively to catalytically active AMO (AmoA), whereby it interferes with ammonia oxidation and acts as a suicide inactivator (Hyman and Wood, 1985; Gilch et al., 2009). When acetylene is added to intact bacteria it reacts with the entire pool of biologically functional active AMO. In this study, [<sup>14</sup>C]acetylene was employed to label active AMO in intact cells of *N. europaea* which allowed to identify and localize AMO in subcellular fractions during purification. Inhibition and labeling of AMO with acetylene in the soluble and membrane fraction occurred exclusively in the presence of ammonia and oxygen.

Table 2

Calculated on AMO bound radioactivity about 45% of functional AMO of *N. europaea* is located in the soluble fraction and the remaining 55% in the membrane fraction (Table 2). This agrees with the presence of about 42% of ammonia oxidation activity in the soluble fraction (Table 1). Same results (Table 1, 2) were obtained upon gentle cell lysis with lysozyme/EDTA or with 1 to 3 French press passages, suggesting that the observed distribution of AMO between cytoplasm and membrane reflects the situation in intact bacteria. Treatment of crude cell free extracts with mild detergents (undecyl- $\beta$ -D-maltoside, CHAPS, TWEEN 20; membrane-bound AMO was not solubilized) did not increase the yield of soluble AMO showing that the enzyme is not attached to the membrane.

### Acetylene binds to a 27 kDa polypeptide of soluble and membrane-bound AMO

Analysis of soluble and membrane fractions prepared from *N. europaea* treated with [<sup>14</sup>C]acetylene by denaturing PAGE revealed that acetylene binds exclusively to a single

polypeptide with same mobility which is present in both fractions (Figure 1). The mass of the polypeptide of ~27 kDa is suggestive for the AmoA subunit (predicted mass 31.9 kDa) of AMO (Hynes and Knowles, 1978; Hyman and Wood, 1985; Chain et al., 2003).

### Figure 1

To verify whether the 27 kDa acetylene binding polypeptide would be associated with other polypeptides in *N. europaea*, intact bacteria were exposed to [<sup>14</sup>C]acetylene and analyzed by BN-PAGE for labeled native protein in soluble and membrane fraction (Figure 2). Both fractions revealed a single indistinguishable  $283 \pm 22$  kDa acetylene binding protein. This indicates that both soluble and membrane-bound AMO either have a homopolymeric subunit structure composed of AmoA or a heteropolymeric subunit structure of AmoA associated with other subunits.

### Figure 2

## Purification and subunit composition of soluble AMO

A protocol was established for the preparation of soluble AMO from *N. europaea* (Table 3). The enzyme was purified 12-fold with a yield of 4% (calculated on basis of soluble AMO the yield was about 8%). The homogeneity of soluble AMO was better than 97% (Table 3; Figure 3). AMO is composed of three non-covalently bound subunits (Figure 3) which were identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (Maldi-Tof) analysis as AmoA (gi\_30248947, gi\_30250003), AmoB (gi\_30248946, gi\_30250002), and cytochrome *c*<sub>1</sub> (gi\_30248815). The identification of the three polypeptides was statistically highly significant with sequence coverage for AmoA, AmoB, and cytochrome *c*<sub>1</sub> of 52, 33, and 38%, respectively. The experimentally determined molecular masses apparent from Figure 3 of AmoA (~27 kDa), AmoB (~42 kDa), and cytochrome *c*<sub>1</sub> (~24 kDa) agree with those predicted by the sequences (31.9, 46.7, and 26.7 kDa, respectively).

### Table 3

### Figure 3

Soluble AMO has an  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$  subunit composition which is evident from the molar stoichiometry of AmoA ( $\alpha$ ), AmoB ( $\beta$ ) and cytochrome  $c_1$  ( $\gamma$ ) of 1.2:1.1:1.0 (Figure 3) and the molecular mass of the holoenzyme of ~283 kDa (Figure 2) which is in accordance with the predicted mass of 315.9 kDa (calculated from the sequences of the three subunits). It could be calculated based on the specific radioactivity of the bound [ $^{14}\text{C}$ ]acetylene, the 1:1 stoichiometry between acetylene and  $\alpha$ -subunit of AMO (Gilch et al., 2009), and the  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$  subunit structure (Figure 3), that functional soluble AMO amounts to about 13% of soluble protein and membrane-bound AMO to about 11% of membrane protein of *N. europaea* (AMO is about 12% of total cell protein). Based on ammonia oxidation activities (Table 1) and the AMO content of intact bacteria and subcellular fractions, specific AMO activities were calculated:  $742 \pm 72 \text{ nmol NH}_3 (\text{mg AMO})^{-1} \text{ min}^{-1}$  (intact bacteria),  $93 \pm 18 \text{ nmol NH}_3 (\text{mg AMO})^{-1} \text{ min}^{-1}$  (crude cell free extract),  $53 \pm 16 \text{ nmol NH}_3 (\text{mg AMO})^{-1} \text{ min}^{-1}$  (membrane-bound AMO), and  $50 \pm 12 \text{ nmol NH}_3 (\text{mg AMO})^{-1} \text{ min}^{-1}$  (soluble AMO).

With a probability of 98.8% the gene sequence of AmoB suggests a signal peptide with 25 amino acids containing typical n-, h-, and c-regions (SignalP 3.0; Nielsen and Krogh 1998; Bendtsen et al., 2004). Interestingly, the N-terminal amino acid sequence of AmoB from soluble AMO shows that the signal peptide is not cleaved (N-terminal sequence: GIKNLYKR). In contrast, the 25 N-terminal amino acids were cleaved from AmoB subunit of membrane-bound AMO (N-terminal sequence: MTVTLDVSTV).

### **Soluble AMO is a cytochrome *c*-containing metalloenzyme**

According to Table 4 purified soluble AMO contains Cu, Fe, and Zn in a molar stoichiometry of about 9:4:3, which fits basically to the  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$  subunit structure, whereas Mn, Mo, Ni, or W do not seem to be relevant constituents of the enzyme.

Table 4

The EPR spectrum of soluble AMO at 50 K in air oxidized state suggests type 2 Cu(II) center(s) with  $g_{\perp} = 2.057$ ,  $g_{\parallel} = 2.24$  and  $|A_{\parallel}| = 176 \text{ G}$  (Figure 4A,C,E). The  $g_{\parallel}$  and  $|A_{\parallel}|$  disappear upon reduction of the enzyme (Figure 4D,F). Corresponding results were reported for pMMO from *Methylosinus trichosporium* OB3b (Takeguchi and Okura, 2000; Hakemian and Rosenzweig, 2008), *Methylobacterium album* BG8 (Yuan et al., 1998) and *M. capsulatus*

(Bath) (Zahn and DiSpirito, 1996) where a type 2 Cu(II) signal with  $g_{\perp} = 2.057$  and  $g_{\parallel} = 2.24$  was detectable. Double spin integration of the EPR spectrum of oxidized AMO indicated that 6 Cu atoms are in the  $\text{Cu}^{2+}$  state implying that the remaining 3 Cu atoms (Table 4) are in the diamagnetic  $\text{Cu}^{1+}$  state. The oxidized and reduced spectra of AMO with bound acetylene were not significantly different from the spectra of AMO without acetylene (Figure 4E,F), indicating that acetylene does not bind directly at  $\text{Cu}^{2+}$ .

#### Figure 4

The visible absorption spectra of soluble AMO in the oxidized and reduced state (Figure 5) are characteristic of *c*-type cytochromes (Lemberg and Barrett, 1973) showing absorption bands in the reduced state at 419 nm ( $\gamma$ ), 522 nm ( $\beta$ ), and 552 nm ( $\alpha$ ). The analysis of Fe in AMO (Table 4) agrees with the presence of cytochrome  $c_1$  (a mono-heme cytochrome  $c_{552}$ ), although the subunit structure of the enzyme would predict only 3 Fe atoms per molecule of AMO (compare 4 Fe; Table 4). The presence of heme in AMO is also indicated by the EPR spectrum of the air-oxidized enzyme exhibiting at 10 K a Fe(III) signal ( $g = 6$ ) in a high spin state (Figure 4B). From the absorption band at 552 nm in the spectrum of reduced AMO (Figure 5) and a molar extinction coefficient of  $30.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Yamanaka and Shinra, 1974) the cytochrome  $c_1$  content of soluble AMO can be calculated;  $2.6 \pm 0.3$  moles of cytochrome  $c_1$  per mol of  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ -structured AMO (315.9 kDa) were obtained (compare subunit stoichiometry according to Figure 3).

The fact that Zn occurs in AMO in significant amounts (Table 4) might suggest a physiological function for that metal. On the other hand, Zn binding in AMO might be adventitious and binding site(s) can be occupied by other metal ions *in vivo*, as has been considered for pMMO (Lieberman and Rosenzweig, 2005).

#### Figure 5

## Discussion

Soluble AMO of *N. europaea* is a heterotrimeric Cu-heme enzyme. With nine Cu atoms per native AMO the Cu content equals that of pMMO (Lieberman and Rosenzweig, 2005). Soluble AMO contains three heme- and one non-heme Fe (Table 4; Figure 4, 5). The



occurrence of heme-Fe is consistent with the presence of three mono-heme cytochromes  $c_1$  per AMO (Figure 2, 3, 5). In addition sub-stoichiometric amounts of non-heme Fe were detectable (Table 4; Figure 4; Zahn et al., 1996). Evidence for a dinuclear Fe center in pMMO was provided by Martinho et al. (2007) and Tumanova et al. (2008). It was suggested that the Fe center was replaced by Zn in the X-ray structure of pMMO (Lieberman and Rosenzweig, 2005). Also in purified soluble AMO Zn was detectable (Table 4) and a replacement of non-heme Fe by Zn can not be excluded yet. Hence, *in vivo* AMO might contain a higher (stoichiometric) amount of non-heme Fe. As a third metal AMO contained 0.5 or 2.6 moles Zn per mole AMO depending on the Zn concentration in buffers applied during purification. During Zn-free purification AMO might have lost Zn atoms resulting in sub-stoichiometric amount of Zn, but purification in the presence of Zn might have caused unspecific integration of Zn atoms and an overestimation of the Zn content. In various enzymes like the class of Zn-dependent dehydrogenases/reductases (alcohol dehydrogenase, sorbitol dehydrogenase, glucose dehydrogenase) Zn has a catalytic and/or structural role (Vallee and Falchuk, 1993; Persson et al., 1994; Auld 2001). Indications for a function of Zn in ammonia oxidation by AMO are not yet identifiable, and it can not be excluded that Zn occupies binding sites of other metals.

The soluble AMO is a trimer with an  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$  polypeptide arrangement (Figure 2, 3). AmoA shows 43% sequence identity with the PmoA subunit of the structurally characterized pMMO from *M. capsulatus* (Bath) (Liebermann and Rosenzweig, 2005). The motif Asp 187 - X<sub>3</sub> - His 191 - X<sub>12</sub> - His 204 of AmoA is indicative for metal (Cu) co-ordination, because His 191 is the acetylene/ketene binding site in AMO. Covalent binding of the inhibitor results in Cu liberation and irreversible AMO inactivation (Gilch et al., 2009). We suggest that Asp 187 - X<sub>3</sub> - His 191 - X<sub>12</sub> - His 204 co-ordinates a Cu center responsible for ammonia oxidation and in virtue of the catalyzed monooxygenase reaction a dinuclear or trinuclear Cu center would be optimal to support oxidation chemistry (Fomina et al., 2002; Chan et al., 2004; Chen and Solomon, 2004; Chen and Chan, 2006; Chen et al., 2007). The lack of an effect of derivatization of soluble AMO by acetylene on the EPR signals (Figure 4) suggests, that co-ordinated paramagnetic Cu<sup>2+</sup> atoms are significantly separated from the acetylene binding site, although binding in close proximity to a diamagnetic Cu<sup>1+</sup>-ion can not be excluded. Cu co-ordination in AmoA is also suggested by the motif His 43 - X<sub>1</sub> - His 45, because pMMO and amine oxidase use His - X<sub>1</sub> - His motifs to co-ordinate Cu (Wilce et al., 1997; Lieberman and Rosenzweig, 2005).

The AmoB subunit is 41% identical with the PmoB subunit (Liebermann and Rosenzweig, 2005). PmoB contains a di- and a mononuclear Cu center (Lieberman and Rosenzweig, 2005; Balasubramanian and Rosenzweig, 2007). The dinuclear Cu center of PmoB is co-ordinated by His 33 - X<sub>103</sub> - His 137 - X<sub>1</sub> - His 139 and is shielded from the solvent by Trp 156 (Lieberman and Rosenzweig, 2005). A similar motif is present in AmoB (His 38 - X<sub>103</sub> - His 142 - X<sub>1</sub> - His 144 and Trp 161). The mononuclear Cu center of PmoB is co-ordinated by His 48 - X<sub>23</sub> - His 72 - X<sub>331</sub> - Gln 404. Two similar motifs are present in AmoB, which are His 77 - X<sub>35</sub> - His 113 - X<sub>264</sub> - Gln 378 and Gln 53 - X<sub>23</sub> - His 77 - X<sub>327</sub> - His 405. Both motifs are candidates for co-ordination of a mononuclear Cu center in AmoB.

In addition to AmoA and AmoB, soluble AMO contains cytochrome *c*<sub>1</sub> as a subunit (Figure 3, 5). Although *amoCAB* are clustered in an operon (Chain et al., 2003), AmoC is not a subunit of soluble AMO (Figure 3). This is in contrast to *pmoCAB* encoded pMMO, where PmoC, a non-heme polypeptide, belongs to functional pMMO and contributes to Zn-binding (Nielsen et al., 1997; Lieberman and Rosenzweig, 2005). Although *amoCAB* are co-transcribed, *amoAB* and *amoC* mRNA are detectable in *N. europaea* (Sayavedra-Soto et al., 1998; Hommes et al., 2001). This might strengthen the finding that AmoA and AmoB are subunits of AMO, and that AmoC might have a different function for example as a chaperone as suggested before (Klotz et al., 1997).

PmoB possesses a highly negative charged patch on the outer surface (Lieberman and Rosenzweig, 2005). Such surfaces, for example in cytochrome-*c* oxidase, were suggested as potential docking sites for partially positively charged cytochrome *c* (Maneg et al., 2004). Therefore, it was suggested that a cytochrome acts as electron carrier for PmoB (Nguyen et al., 1998; Lieberman and Rosenzweig, 2005). Cytochrome *c*<sub>1</sub> is a subunit of soluble AMO (Figure 3, 5) and based on the sequence similarity between AmoB and PmoB (high number of negatively charged amino acids in both subunits), AmoB might interact with cytochrome *c*<sub>1</sub>. It can be assumed that cytochrome *c*<sub>1</sub> is the first electron carrier site of AMO, transferring electrons to metal sites located in AmoB.

Several lines of evidence indicate a cytoplasmic localization of soluble AMO in *N. europaea*. First, soluble AMO is not a periplasmic enzyme, because an AMO activity was not detectable in the periplasmic fraction (Table 1). Second, the AmoB subunit of soluble AMO possesses its N-terminal signal sequence, which would be cleaved after export into the periplasm. Third, in active *N. europaea* the pH value in the periplasmic space is between 5 and 6 (Weidinger et al., 2007), but AMO is inactive at pH values below 6.5 (Suzuki and Kwok, 1974; Frijlink et al., 1992; Schmidt and Bock, 1998). Soluble AMO is active *in vivo*

(activates and binds acetylene; Figure 1, 2, Table 2), but the low pH in the periplasm would obstruct activity. In contrast, the pH value of the cytoplasm with about 7.5 (Kumar and Nicholas, 1982) is optimal for AMO activity (Suzuki and Kwok, 1974; Suzuki et al., 1981; Schmidt and Bock, 1998). Fourth, *N. europaea* possess a functional Rhesus-type ammonium transporter, supporting ammonia uptake into the cytoplasm (Weidinger et al., 2007).

Soluble and membrane-bound AMO have functional and structural features in common (Table 1, 2; Figure 1, 2). The gene *amoB* encodes a predicted N-terminal 25 amino acid signal sequence (SignalP 3.0). In membrane-bound AmoB the N-terminal sequence is cleaved (see above) and cleavage of up to 37 N-terminal amino acids was reported (McTavish et al., 1993). In contrast, the soluble AmoB subunit possesses the complete N-terminal amino acid sequence encoded by *amoB* (see above). According to the membrane trigger hypothesis (Wickner, 1979) it is quite possible that the presence of the N-terminal sequence alters folding of AMO, resulting in a soluble conformation of the protein. N-terminal signal sequences can affect local differences in main chain positions and side chain orientations (Firbank et al., 2003), allowing potential membrane proteins to fold in a manner compatible with an aqueous environment. These differences can result in more than one functional conformation (Wickner, 1979; Firbank et al., 2003). This has been demonstrated for L-lactate dehydrogenase (Kimura and Futai, 1978) and pyruvate oxidase (Schrock and Gennis, 1977) of *Escherichia coli*, which are active in soluble as well as membrane-bound conformation. Membrane-bound AMO should have an approximately 2.6 kDa lower molecular mass per AmoB subunit (calculated mass of cleaved 25 amino acid signal peptide). Nevertheless, molecular masses of soluble and membrane-bound AMO on BN-PAGE are indistinguishable (Figure 2), suggesting the same  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$  subunit composition for both proteins.

Soluble AMO is a functional catalytically active heterotrimeric enzyme complex ( $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ ) including assembled metal sites (Table 1, 2, 4; Figure 2, 3), and soluble AMO is apparently not a pre-protein of membrane-bound AMO: First, pre-proteins are usually inactive and do not arrange as complexes. Complex assembly and metal integration of membrane-proteins occurs after transferring the pre-protein(s) into the membrane (Kulajta et al., 2006; Suzuki et al., 2007; Daley, 2008). Second, soluble AMO amounts to about 50% of total AMO in *N. europaea*, but pre-proteins occur in significantly lower proportions and are rapidly integrated into the membrane (Daley, 2008). Third, assembly of an enzyme complex like soluble AMO and metal integration requires energy. Investment of energy to assemble soluble AMO as a pre-protein complex would be inappropriate from an energetical point of view, when the complex has to be disassembled again for membrane integration. Anyhow, the

possibility of disassembly of a soluble AMO complex and reassembly as a membrane-bound AMO can not yet be excluded experimentally.

This study has established the coexistence of approximately same amounts of soluble and membrane-bound AMO in *N. europaea*. Both enzymes exhibit similar specific ammonia oxidation activities and are functional in intact bacteria (Table 1, 2; Figure 1, 2). Previous reports have exclusively described AMO in membranes of *N. europaea* (Hooper et al., 1997; Arp et al., 2002). The sequences of the two *amoA* and *amoB* copies in the genome of *N. europaea* are identical indicating same gene products. The factors leading to formation of soluble or membrane-bound AMO are not known. In methanotrophic bacteria the Cu content of the environment determines the expression of soluble or particulate MMO which, in contrast to AMO, are encoded by distinct genetic entities (Dalton et al., 1993; Lipscomb, 1994; Zahn and DiSpirito, 1996). Although both AMO's contain the subunits AmoA and AmoB (Figure 3; McTavish et al., 1993) and their apparent native masses are indistinguishable (Figure 2), it is currently not definitely known whether the cytochrome *c*<sub>1</sub> subunit of soluble AMO is also part of membrane-bound AMO.

Under appropriate conditions, AmoA is capable of binding the mechanism-based inhibitor acetylene in a covalent fashion (Table 1, 2; Figure 1, 2). This indicates that in intact bacteria soluble AMO, like membrane-bound AMO, is accessible for ammonia, electrons, and oxygen and is capable of processing them (Figure 1, 2). Like oxygen, ammonia is able to enter cytoplasm by passive diffusion (Kleiner, 1985), whereby the presence of a functional Rhesus type ammonia transporter accelerates ammonia uptake (Weidinger et al., 2007). The required electrons might be provided by a soluble cytochrome like *c*<sub>550</sub>, *c*<sub>552</sub>, or *c*<sub>554</sub> (Andersson et al., 1986; Miller and Wood, 1982) or through contact of the soluble AMO with a membrane-bound electron carrier.

The genomes of the  $\beta$ -proteobacterial ammonia oxidizers *N. europaea* (ATCC 19718), *Nitrosomonas eutropha* (C91), and *Nitrospira multiformis* (ATCC 25196) are available at present, and the sequences of soluble AMO encoding genes (*amoA*, *amoB*, *cytochrome c*<sub>1</sub>) are highly conserved within these genomes. Even in the genome of *Nitrosococcus oceani* (ATCC 19707,  $\gamma$ -proteobacterium) the three subunits of soluble AMO are conserved. Consequently, it can be assumed that these ammonia oxidizers might also possess a soluble AMO, and soluble AMO activity has already been shown for *N. eutropha* (Schmidt and Bock, 1998). Evidently, soluble AMO contributes to energy conservation of ammonia oxidizers and the enzyme might therefore be of ecological importance for chemolithotrophic ammonia oxidation.

## Materials and methods

### Organism and growth conditions

*N. europaea* (ATCC 19718) was grown in a fermentor of 50 l total volume (model Biostat, Braun, Melsungen, Germany) supplied with 30 l mineral medium (Schmidt and Bock, 1997) under discontinuous conditions (Gilch et al., 2009). Bacteria were harvested in late exponential growth phase at a cell number of  $5 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$  cells ml<sup>-1</sup>. Cell suspensions were concentrated by cross-flow filtration (Hemoflow HF80S, Fresenius, Bad Homburg, Germany) and sedimented by low spin centrifugation. The sediment was washed twice by centrifugation in ice cold buffer A (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.5) and used immediately or stored at -80°C until use. Purity of cultures was checked by plating on complex solid media or in liquid cultures as well as by phase-contrast microscopy.

### Production of [<sup>14</sup>C]acetylene and <sup>14</sup>C-labeling of AMO

Acetylene was produced from barium carbide (BaC<sub>2</sub>) according to Hyman and Arp (1990). Ba<sup>14</sup>C<sub>2</sub> (108 mCi mmol<sup>-1</sup>, Biotrend, Cologne, Germany; on average one <sup>14</sup>C per BaC<sub>2</sub>) and Ba<sup>12</sup>C<sub>2</sub> were mixed 1:10 and [<sup>14</sup>C]acetylene was released in a closed glass bottle upon addition of water. Acetylene was dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) which was placed in a second compartment of the bottle and was stored at -80°C.

To label AMO, *N. europaea* cells (1 g wet weight) were suspended in mineral medium without ammonium (4 ml) in a 25-ml serum flask sealed with a butyl rubber stopper. NH<sub>4</sub>Cl was added from a 1 M stock solution to a final concentration of 10 mM and acetylene from a 2.3 μM [<sup>14</sup>C]acetylene solution in DMSO to a final concentration of 5.8 nM (63 μCi). Labeling (inhibition) of AMO was considered complete when nitrite concentration remained constant for 10 min. Unbound acetylene was removed, washing bacteria five times by centrifugation in buffer A.

### Assay of AMO for ammonia oxidation

Oxidation of ammonia by AMO in intact bacteria and subcellular fractions of *N. europaea* was assayed according to Schmidt and Bock (1998). Assays with subcellular fractions were performed in the presence of duroquinol (10 mM, reduced with

sodiumborhydride) as electron donor. To prepare subcellular fractions, 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  and 0.5 mM PMSF were added and bacteria were disrupted by French press (eight passages at maximum pressure). Unbroken cells were sedimented by low spin centrifugation. To separate membranes and soluble proteins the supernatant was subjected to ultracentrifugation at 160 000  $g$  for 4 h at 4°C. Periplasmic fraction was prepared with sodium-EDTA and lysozyme in isotonic buffer as described by Bhandari and Nicholas (1980).

### **Purification of soluble AMO**

*N. europaea* cells were disrupted by French press (eight passages at maximum pressure) in the presence of 0.2 mM PMSF and 5 g DNase I in buffer B containing: 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (pH 7.5). The soluble protein fraction was prepared by ultracentrifugation at 160 000  $g$  for 4 h at 4°C. The supernatant was loaded onto an anion exchange chromatography column (Source 30Q in a XK-50 column, Amersham Biosciences) equilibrated with buffer B and was then eluted with 880 ml of buffer B followed by the same volume of a linear gradient of 0 to 1 M KCl in buffer B. The fraction containing AMO was loaded onto a cation exchange chromatography column (CM 32 Cellulose SERVACEL<sup>®</sup> in a XK-50 column, Serva) equilibrated with buffer B. Proteins were eluted with 820 ml of buffer B followed by the same volume of a linear gradient of 0 to 1 M KCl in buffer B. Next, an ammonium sulfate precipitation was carried out by supplementing the AMO fraction with ammonium sulfate from a saturated stock solution to a final concentration of 30% (w/v), whereas AMO remained soluble. Precipitated protein was removed by centrifugation at 10 000  $g$  for 30 min at 4°C. The AMO containing supernatant was loaded onto a hydrophobic interaction chromatography column (butyl-Sepharose 4 fast flow, Amersham Biosciences) equilibrated with buffer B containing 30% (w/v) ammonium sulfate and was eluted with a linear gradient of 30 to 0% (w/v) ammonium sulfate and 0 to 30% (v/v) isopropanol in buffer B. The AMO containing fraction was subjected to precipitation with 40% (w/v) ammonium sulfate, AMO was sedimented by centrifugation (10 000  $g$ , 30 min, 4°C) and the sediment was resuspended in buffer B. Remaining ammonium sulfate was removed by gel filtration on Sephadex G-25 with buffer B.

## Electrophoresis

Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to Laemmli (1970) on 12% gels at 10 to 30 mA for about 14 h. Protein samples were supplemented with an equal volume of a buffer containing 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 125 mM Tris/HCl, pH 6.8, 0.002% bromophenol blue, and 10% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol. Samples were incubated for 10 min at 20°C to prevent thermal dependent aggregation of the AmoA subunit (Hyman and Arp, 1993). Protein was stained in gel with 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 in aqueous solution with 5% (v/v) acetic acid and 25% (v/v) methanol. Molecular mass standards (peqGOLD Protein Marker I, Peqlab, Erlangen, Germany) were employed for standardization. To evaluate the subunit composition of AMO, stained gels were scanned, and densitograms were integrated with the program ImageJ (1.34s, Wayne Rashband, NIH).

Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) was performed according to Schägger (2003) at 10 to 30 mA for about 18 h. Gels were stained for protein as described above. To solubilize membrane proteins for BN-PAGE, membrane fractions were supplemented with 6% (w/v) Triton X-100 and gently stirred (20 r.p.m.) for 4 h at 4°C, centrifuged for 4 h at 160 000 g in order to remove indissoluble protein.

## Scintillation autoradiographic (fluorography) analysis of radioactively labeled AMO

Stain was removed from gels, water was replaced by DMSO, and gels were soaked in four volumes of 20% (w/w) 2,5-diphenyloxazol (PPO) in DMSO for 3 h. PPO in gels was crystallized by immersion of the gels in 20 volumes of cold water for 1 h. Gels were then dried on Whatman filter paper (vacuum, 1 h at 80°C) and placed in an X-ray cassette with a high performance chemoluminescence film (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences). The cassette was stored at -80°C for 10 to 14 d before developing the autoradiograph.

## Mass spectrometry and N-terminal sequencing

The subunits of purified AMO were separated by SDS-PAGE and polypeptide bands were cut from gel. Tryptic digest and Maldi-Tof mass spectrometry was performed as described before (Schmidt et al., 2004; Kniemeyer et al., 2006). Polypeptides were identified by peptide mass fingerprinting with calculated  $m/z$  values from *N. europaea* genome database.

To analyze the N-terminal amino acid sequence of AmoB, the polypeptide (about 20 pmol) was blotted from SDS-PAGE on a PVDF membrane and the amino acid sequence was analysed by Edman degradation (Seqlab, Göttingen, Germany).

### Miscellaneous analytic procedures

Metals in purified AMO were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Samples (250  $\mu$ l with 1.63 mg AMO  $\text{ml}^{-1}$ ) were diluted in an equal volume of concentrated nitric acid and digested for 24 h at 110°C. Samples were diluted with distilled water to 0.16 mg AMO  $\text{ml}^{-1}$  and analyzed for Cu, Fe, Zn, Mn, Mo, Ni, and W.

Radioactivity was measured after aliquots were suspended in scintillation liquid (Rotiszint EcoPlus, Roth, Karlsruhe, Germany) by liquid scintillation counting (LSC; BETAmatic BASIC, Kontron Analytical).

X-band EPR spectra were recorded on an EMX spectrometer (EPR spectrometer ECS 106, Bruker, Rheinstetten, Germany) with a helium cryostat (ESR 900 cryostat, Oxford instruments, Abingdon, United Kingdom) under experimental conditions described by Hänzelmann and Meyer (1998) and Bray et al. (1983). The spectra were recorded with AMO samples of 10 mg  $\text{ml}^{-1}$ . The  $\text{Cu}^{2+}$  concentration of AMO was obtained by double integration and comparison with a 1 mM cupric perchlorate standard. The Fe signal was compared with a 1 mM transferrin standard.

Visible absorption spectra were recorded on a spectrophotometer (Uvikon 941, Kontron Instruments) using quartz cuvettes of 1 cm path length. Analyzed solutions contained 1 mg AMO  $\text{ml}^{-1}$  in buffer A. To reduce AMO, 5 mM sodium dithionite (DT) was added under  $\text{N}_2$ .

Ammonium was measured according to Schmidt and Bock (1997) (*ortho*-phthaldialdehyde reagent). Protein concentrations were determined by the biuret assay (Bonner and Laskey, 1974). The concentration of cytochrome  $c_1$  was measured by the pyridine hemochromogen method using a  $\Delta\epsilon_{552}$  of 30.6  $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Yamanaka and Shinra, 1974). Lysis of *N. europaea* cells (20 mg protein  $\text{ml}^{-1}$ ) was performed with lysozyme (1 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) and 2 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  in 50 mM Tris/HCl buffer (pH 8) for 1 h at 30°C under gentle stirring.



## Acknowledgements

This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn, Germany. We thank Dipl.-Biol. Martin Vödisch, Dr. Olaf Kniemeyer and Prof. Dr. Axel A. Brakhage, Department of Molecular and Applied Microbiology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology e.V., -Hans Knöll Institute-, Jena, Germany for protein identification by Maldi-Tof mass spectrometry. We thank Jasmin Wickinghoff and Matthias Schlotter for technical assistance.

## References

- Andersson, K.K., Lipscomb, J.D., Valentine, M., Münck, E., and Hooper, A.B. (1986). Tetraheme cytochrome *c*-554 from *Nitrosomonas europaea*. Heme-heme interactions and ligand binding. *J. Biol. Chem.* *261*, 1126-1138.
- Arp, D.J., Sayavedra-Soto, L.A., and Hommes, N.G. (2002). Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* *178*, 250-255.
- Auld, D.S. (2001). Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals* *14*, 271-313.
- Balasubramanian, R., and Rosenzweig, A.C. (2007). Structural and mechanistic insights into methane oxidation by particulate methane monooxygenase. *Acc. Chem. Res.* *40*, 573-580.
- Basu, P., Katterle, B., Andersson, K.K., and Dalton, H. (2003). The membrane-associated form of methane mono-oxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a copper/iron protein. *Biochem. J.* *369*, 417-427.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* *340*, 783-795.
- Bhandari, B., and Nicholas, D.J.D. (1980). Preparation of membrane vesicles in lithium chloride from cells of *Nitrosomonas europaea*. *Anal. Biochem.* *109*, 330-337.
- Bonner, W.M., and Laskey, R.A. (1974). A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* *46*, 83-88.
- Bray, R.C., George, G.N., Lange, R., and Meyer, O. (1983). Studies by e.p.r. spectroscopy of carbon monoxide oxidases from *Pseudomonas carboxydovorans* and *Pseudomonas carboxydohydrogena*. *Biochem. J.* *211*, 687-694.

- Chain, P.S., Lamerdin, J.E., Larimer, F.W., Regala, W., Lao, V., Land, M.L., Hauser, L.J., Hooper, A.B., Klotz, M.G., Norton, J.M. et al. (2003). Complete genome sequence of the ammonia oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* *185*, 2759-2773.
- Chan, S.I., Chen, K.H.-C., Yu, S.S.-F., Chen, C.-L., and Kuo S.S.-J. (2004). Toward delineating the structure and function of the particulate methane monooxygenase from methanotrophic bacteria. *Biochemistry* *43*, 4421-4430.
- Chen, P., and Solomon, E.I. (2004). O<sub>2</sub> activation by binuclear Cu sites: noncoupled versus exchange coupled reaction mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 13105-13110.
- Chen, P.P., and Chan, S.I. (2006). Theoretical modeling of the hydroxylation of methane as mediated by the particulate methane monooxygenase. *J. Inorg. Biochem.* *100*, 801-809.
- Chen, P.P., Yang, R.B., Lee, J.C., and Chan, S.I. (2007). Facile O-atom insertion into C-C and C-H bonds by a trinuclear copper complex designed to harness a singlet oxene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 14570-14575.
- Choi, D.W., Kunz, R.C., Boyd, E.S., Semrau, J.D., Antholine, W.E., Han, J.I., Zahn, J.A., Boyd, J.M., de la Mora, A.M., and DiSpirito, A.A. (2003). The membrane-associated methane monooxygenase (pMMO) and pMMO-NADH:quinone oxidoreductase complex from *Methylococcus capsulatus* Bath. *J. Bacteriol.* *185*, 5755-5764.
- Daley, O.D. (2008). The assembly of membrane proteins into complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *18*, 420-424.
- Dalton, H., Wilkins, P., and Jiang, Y. (1993). Structure and mechanism of action of the hydroxylase of soluble methane monooxygenase. In: *Microbial growth on C<sub>1</sub> compounds*, J.C. Murrell and D.P. Kelly, eds. (Andover, England: Intercept Press), pp. 65-80.
- Ensign, S.A., Hyman, M.R., and Arp, D.J. (1993). *In vitro* activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. *J. Bacteriol.* *175*, 1971-1980.
- Firbank, S.J., Rogers, M., Hurtado-Guerrero, R., Dooley, D.M., Halcrow, M.A., Phillips, S.E.V., Knowles, P.F., and McPherson M.J. (2003). Cofactor processing in galactose oxidase. *Biochem. Soc. Transac.* *31*, 506-509.
- Fomina, L., Vazquez, B., Tkatchouk, E., and Fomine, S. (2002). The Glaser reaction mechanism. A DFT study. *Tetrahedron* *58*, 6741-6747.
- Frijlink, M., Abee, T., Laanbroek, H.J., de Boer, W., and Konings, W.N. (1992). The bioenergetics of ammonia and hydroxylamine oxidation in *Nitrosomonas europaea* at acid and alkaline pH. *Arch. Microbiol.* *157*, 194-199.

- Gilch, S., Vogel, M., Lorenz, M.W., Meyer, O., and Schmidt, I. (2009). Interaction of the mechanism-based inactivator acetylene with ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Microbiology* 155, 279-284.
- Hänzelmann, P., and Meyer, O. (1998). Effect of molybdate and tungstate on the biosynthesis of CO dehydrogenase and the molybdopterin cytosine-dinucleotide-type of molybdenum cofactor in *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Eur. J. Biochem.* 255, 755-765.
- Hakemian, A.S., Kondapalli, K.C., Telser, J., Hoffman, B.M., Stemmler, T.L., and Rosenzweig, A.C. (2008). The metal centers of particulate methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochemistry* 47, 6793-6801.
- Hiep-Hoa, T., Nguyen, S.J.E., Yip, J.H., and Chan, S.I. (1997). The particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a novel copper-containing three-subunit enzyme. *J. Biol. Chem.* 273, 7957-7966.
- Hommes, N.G., Sayavedra-Soto, L.A., and Arp, D.J. (1998). Mutagenesis and expression of *amo*, which codes for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 180, 3353-3359.
- Hommes, N.G., Sayavedra-Soto, L.A., and Arp, D.J. (2001). Transcript analysis of multiple copies of *amo* (encoding ammonia monooxygenase) and *hao* (encoding hydroxylamine oxidoreductase) in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 183, 1096-1100.
- Hooper, A.B., and Terry, K.R. (1973). Specific inhibitor of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.* 115, 480-485.
- Hooper, A.B., Vannelli, T., Bergmann, D.J., and Arciero, D.M. (1997). Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 71, 59-67.
- Hyman, M.R., and Wood, P.M. (1985). Suicidal inactivation and labeling of ammonia monooxygenase by acetylene. *Biochem. J.* 227, 719-725.
- Hyman, M.R., and Arp, D.J. (1990). The small-scale production of [U-<sup>14</sup>C]acetylene from Ba<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>: application to labeling of ammonia monooxygenase in autotrophic nitrifying bacteria. *Anal. Biochem.* 190, 348-353.
- Hyman, M.R., and Arp, D.J. (1993). An electrophoretic study of the thermal- and reductant-dependent aggregation of the 27 kDa component of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *Electrophoresis* 14, 619-627.
- Hynes, R.K., and Knowles, R. (1978). Inhibition by acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol. Lett.* 4, 319-321.

- Juliette, L.J., Hyman, M.R., and Arp, D.J. (1995). Roles of bovine serum albumin and copper in the assay and stability of ammonia monooxygenase activity in vitro. *J. Bacteriol.* 177, 4908-4913.
- Kimura, H., and Futai, M. (1978). Effects of phospholipids on L-lactate dehydrogenase from membranes of *Escherichia coli*. Activation and stabilization of the enzyme with phospholipids. *J. Biol. Chem.* 253, 1095-1110.
- Kleiner, D. (1985). Bacterial ammonia transport. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 87-100.
- Klotz, M.G., Alzerreca, J., and Norton, J.M. (1997). A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the *amo* operon? *FEMS Microbiol. Lett.* 150, 65-73.
- Kniemeyer, O., Lessing, F., Scheibner, O., Hertweck, C., and Brakhage, A.A. (2006). Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Genet.* 49, 178-189.
- Kulajta, C., Thumfart, J. O., Haid, S., Daldal, F., and Koch, H.-G. (2006). Multi-step assembly pathway of the *cbb<sub>3</sub>*-type cytochrome *c* oxidase complex. *J. Mol. Biol.* 355, 989-1004.
- Kumar, S., and Nicholas, D.J.D.. (1983). Proton electrochemical gradient in washed cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *J. Bacteriol.* 154, 65-71.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lemberg, R., and Barrett, J. (1973). Bacterial cytochromes and cytochromes oxidases. In: *Cytochromes*, R. Barrett and J. Lemberg, eds. (London, New York: Academic Press), pp. 217-326.
- Lieberman, R.L., and Rosenzweig, A.C. (2005). Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* 434, 177-182.
- Lipscomb, J.D. (1994). Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 371-399.
- Loveless, J.E., and Painter, H.A. (1968). The influence of metal ion concentrations and pH value on the growth of a *Nitrosomonas* strain isolated from activated sludge. *J. Gen. Microbiol.* 52, 1-14.
- Maneg, O., Malatesta, F., Ludwig, B., and Drosou, V. (2004). Interaction of cytochrome *c* with cytochrome oxidase: two different docking scenarios. *Biochim. Biophys. Acta* 1655, 274-281.

- Martinho, M., Choi, D.W., DiSpirito, A.A., Antholine, W.E., Semrau, J.D., and Münck, E. (2007). Mössbauer Studies of the membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* Bath: Evidence for a diiron center. *J. Am. Chem. Soc.* *129*, 15783-15785.
- McTavish, H., Fuchs, J.A., and Hooper, A.B. (1993). Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* *175*, 2436-2444.
- Miller, D.J., and Wood, P.M. (1982). Characterization of the *c*-type cytochromes of *Nitrosomonas europaea* with the aid of fluorescent gels. *Biochem. J.* *207*, 511-517.
- Nguyen, H.H., Elliott, S.J., Yip, J.H., and Chan, S.I. (1998). The particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a novel copper-containing three-subunit enzyme. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* *273*, 7957-7966.
- Nielsen, A.K., Gerdes, K., and Murrell, J.C. (1997). Copper-dependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium*. *Mol. Microbiol.* *25*, 399-409.
- Nielsen, H., and Krogh, A. (1998). Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* *6*, 122-130.
- Persson, B., Zigler, J.S., and Jörnvall, H. (1994). A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Sub-lines including zeta-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductase enoyl reductases, VAT-1 and other proteins. *Eur. J. Biochem.* *226*, 15-22.
- Rees, M., and Nason, A. (1966). Incorporation of atmospheric oxygen into nitrite formed during ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Acta.* *113*, 398-401.
- Sayavedra-Soto, L.A., Hommes, N.G., Alzerreca, J.J., Arp, D.J., Norton, J.M., and Klotz M.G. (1998). Transcription of the *amoC*, *amoA* and *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol. Lett.* *167*, 81-88.
- Schägger, H. (2003). Blue native electrophoresis. In: *Membrane protein purification and crystallization: a practical guide*, G. v. Jagow and H. Schägger, eds. (Amsterdam, Netherlands: Academic Press), pp. 105-130.
- Schmidt, I., and Bock, E. (1997). Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Arch. Microbiol.* *167*, 106-111.
- Schmidt, I., and Bock, E. (1998). Anaerobic ammonia oxidation by cell-free extracts of *Nitrosomonas eutropha*. *Antonie van Leeuwenhoek.* *73*, 271-278.

- Schmidt, I., Bock, E., and Jetten, M.S.M. (2001). Ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* with NO<sub>2</sub> as oxidant is not inhibited by acetylene. *Microbiology*. 147, 2247-2253.
- Schmidt, I., and Jetten, M.S.M. (2004). Anaerobic oxidation of inorganic nitrogen compounds. In: Strict and facultative anaerobes: medical and environmental aspects, M.M. Nakano and P. Zuber, eds. (Heidelberg, Germany: Springer Horizon Scientific Press), pp. 283-303.
- Schmidt, I., Steenbakkers, P.J.M., op den Camp, H.J.M., Schmidt, K., and Jetten, M.S.M. (2004). Physiologic and proteomic evidence for a role of nitric oxide in biofilm formation by *Nitrosomonas europaea* and other ammonia oxidizers. *J. Bacteriol.* 186, 2781-2788.
- Schrock, H.L., and Gennis, R.B. (1977). High affinity lipid binding sites on the peripheral membrane enzyme pyruvate oxidase. Specific ligand effects on detergent binding. *J. Biol. Chem.* 252, 5990-5995.
- Semrau, J.D., Zoladz, D., Lidstrom, M.E., and Chan, S.I. (1995). The role of copper in the pMMO of *Methylococcus capsulatus* (Bath): A structural vs. catalytic function. *J. Inorg. Biochem.* 58, 235-244.
- Suzuki, I., and Kwok, S.C. (1970). Cell-free ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* extracts: Effects of polyamines, Mg<sup>2+</sup> and albumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 950-955.
- Suzuki, I., and Kwok, S.C. (1974). Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J. Bacteriol.* 120, 556-558.
- Suzuki, I., Kwok, S.C., Dular, U., and Tsang, D.C.Y. (1981). Cell-free ammonia oxidizing system of *Nitrosomonas europaea*: general conditions and properties. *Can. J. Biochem.* 59, 477-483.
- Suzuki, T., Ozaki, Y., Sone, N., Feniouk, B.A., and Yosida, M. (2007). The product of *uncI* gene in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase operon plays a chaperone-like role to assist c-ring assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 20776-20781.
- Takeguchi, M., and Okura, I. (2000). Role of iron and copper in particulate methane monooxygenase of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Catalysis Surveys*. 4, 51-63.
- Tumanova, L.V., Tukhvatullin, I.A., Burbaev, D.S., Gvozdev, R.I., and Andersson, K.K. (2008). The binuclear iron site of membrane-bound methane hydroxylase from *Methylococcus capsulatus* (strain M). *Rus. J. Bioorg. Chem.* 34, 194-203.

- Vallee, B.L., and Falchuk, K.H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 73, 79-118.
- Weidinger, K., Neuhäuser, B., Gilch, S., Ludewig, U., Meyer, O., and Schmidt, I. (2007). Functional and physiological evidence for a Rhesus-type ammonia transporter in *N. europaea*. *FEMS Microbiol. Lett.* 273, 260-267.
- Wickner, W. (1979). The assembly of proteins into biological membranes: The membrane trigger hypothesis. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 23-45.
- Wilce, M.C.J., Dooley, D.M., Freeman, H.C., Guss, J.M., Matsunami, H., McIntire, W.S., Ruggiero, C.E., Tanizawa, K., and Yamaguchi, H. (1997). Crystal structures of the copper-containing amine oxidase from *Arthrobacter globiformis* in the holo and apo forms: implications for the biogenesis of topaquine. *Biochemistry.* 36, 16116-16133.
- Wood, P.M. (1986). Nitrification as a bacterial energy source. In: Nitrification, J.I. Prosser, eds. (Washington D.C., USA: IRL Press), pp. 39-62.
- Yamanaka, T., and Shinra, M. (1974). Cytochrome *c*-552 and cytochrome *c*-554 derived from *Nitrosomonas europaea*. Purification, properties, and their function in hydroxylamine oxidation. *J. Biochem.* 75, 1265-1273.
- Yuan, H., Collins, M.L., and Antholine, W.E. (1998). Concentration of Cu, EPR-detectable Cu, and formation of cupric-ferrocyanide in membranes with pMMO. *J. Inorg. Biochem.* 72, 179-185.
- Zahn, J.A., and DiSpirito, A.A. (1996). Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Bacteriol.* 178, 1018-1029.
- Zahn, J.A., Arciero, D.M., Hooper, A.B., and DiSpirito, A.A. (1996). Evidence for an iron center in the ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Lett.* 397, 35-38.

## Tables

**Table 1** AMO activity in intact cells of *N. europaea* and subcellular fractions with duroquinol as electron donor. The ammonia oxidation activity in all fractions could be inhibited by addition of acetylene. Applying [ $^{14}\text{C}$ ]acetylene only the 27 kDa AmoA subunit became  $^{14}\text{C}$ -labeled. Other electron donors like reduced horse heart cytochrome were not able to significantly support ammonia oxidation in subcellular fractions. Growing bacteria had a specific activity of about  $108 \text{ nmol NH}_3 (\text{mg protein})^{-1} \text{ min}^{-1}$  when harvested for experiments. Data are average values of six replicated experiments ( $\pm \text{SD}$ ).

| Fraction                             | Specific activity AMO<br>( $\text{nmol NH}_3 (\text{mg protein})^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) | Total activity AMO<br>( $\mu\text{mol NH}_3 \text{ min}^{-1}$ ) |
|--------------------------------------|---|---|
| Intact cells <sup>a</sup>            | 89.1 $\pm$ 8.6  | 89.1 $\pm$ 8.6  |
| Crude cell free extract <sup>b</sup> | 11.2 $\pm$ 2.2  | 9.0 $\pm$ 1.8   |
| Membrane fraction <sup>c</sup>       | 5.8 $\pm$ 1.8   | 2.6 $\pm$ 0.8   |
| Soluble fraction <sup>d</sup>        | 6.5 $\pm$ 1.5   | 1.9 $\pm$ 0.4   |
| Periplasmic fraction                 | n.d.  | n.d.  |

Per assay: <sup>a</sup> 1000 mg protein. Specific activity after harvesting, washing, and suspending bacteria in buffer for activity test; <sup>b</sup> 800 mg protein (200 mg lost upon cell disruption and removal of cell debris); <sup>c</sup> 440 mg membrane protein; <sup>d</sup> 290 mg soluble protein (in total 70 mg protein lost upon preparation of membrane and soluble fraction). n.d. not detectable.

**Table 2** Abundance of  $^{14}\text{C}$ -labeled AMO in intact cells and subcellular fractions of *N. europaea*. Data are average values of five replicated experiments (SD 15%).

|                         | Total protein |                  | Total radioactivity |                  |
|-------------------------|---------------|------------------|---------------------|------------------|
|                         | (mg)          | (%)              | (nCi)               | (%)              |
| Intact bacteria         | 3.85          | 100 <sup>a</sup> | 51.1                | 100 <sup>a</sup> |
| Crude cell free extract | 2.71          | 70.4             | 36.3                | 71.0             |
| Membrane fraction       | 1.51          | 39.2             | 18.7                | 36.6             |
| Soluble fraction        | 1.03          | 26.8             | 15.1                | 29.5             |

<sup>a</sup> The amount of protein or radioactivity of intact bacteria was set at 100%.



**Table 3** Purification table for soluble AMO from *N. europaea*. The soluble AMO containing fraction was analyzed by SDS-PAGE and the AMO content was determined by integration of the peak areas of AMO subunits on corresponding densitograms. All data represent the status of the sample after the specified procedure. This protocol was applied to purify AMO with or without bound acetylene.

|   | Vol. | Protein<br>concentration | Total<br>protein | AMO<br>(mg)        | AMO<br>content<br>(%) | Purification<br>(-fold) | Yield<br>(%)     |
|---|------|--------------------------|------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|------------------|
|   | (ml) | (mg/ml)                  | (mg)             | (mg)               | (%)                   | (-fold)                 | (%)              |
| Crude cell free extract   | 210  | 18.2                     | 3822.0           | 313.8 <sup>a</sup> | 8.2 <sup>a</sup>      | 1.0                     | 100 <sup>a</sup> |
| Ultracentrifugation (supernatant)   | 185  | 7.1                      | 1313.5           | 155.2              | 11.8                  | 1.4                     | 49               |
| Anion exchange chromatography   | 144  | 1.4                      | 201.6            | 78.5               | 38.9                  | 4.7                     | 25               |
| Cation exchange chromatography  | 162  | 0.7                      | 113.4            | 54.6               | 48.1                  | 5.9                     | 17               |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation (30% w/v) and<br>hydrophobic interaction chromatography | 360  | 0.2                      | 72.0             | 42.7               | 59.3                  | 7.2                     | 14               |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation (40% w/v) and<br>gelfiltration                          | 4    | 2.9                      | 11.6             | 11.3               | 97.4                  | 11.9                    | 4                |

<sup>a</sup> membrane and soluble AMO.

**Table 4** Metal analysis of purified soluble AMO. Buffer A: Metal content of the protein-free buffer. AMO in buffer A: Metal content of AMO in buffer A. Metal atoms per AMO ( $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ ): Calculated metal content of soluble AMO. Before metal analysis the AMO samples were subjected to gel filtration. Data are average values of the analysis of three independent samples ( $\pm$  SD).

|   | Cu                              | Fe                              | Zn  | Mn   | Ni  | Mo   | W    |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---|------|-----|------|------|
| Buffer A; metal concentration ( $\mu$ M)                        | 1.1 $\pm$ 0.3                   | 0.4 $\pm$ 0.1                   | 0.2 $\pm$ 0.1                               | 0.1  | 0.0 | 0.0  | 0.0  |
| AMO in buffer A <sup>a</sup> ; metal concentration ( $\mu$ M)   | 49.7 $\pm$ 3.7                  | 20.7 $\pm$ 2.4                  | 13.6 $\pm$ 1.6                              | 0.5  | 0.5 | 0.2  | 0.1  |
| Metal atoms per AMO <sup>b</sup> (mol [mol AMO] <sup>-1</sup> ) | <b>9.4 <math>\pm</math> 0.6</b> | <b>3.9 <math>\pm</math> 0.3</b> | <b>2.6 <math>\pm</math> 0.4<sup>c</sup></b> | 0.08 | 0.1 | 0.04 | 0.02 |

<sup>a</sup> soluble AMO concentration was 1.63 mg ml<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> metal content was calculated on the basis of a molecular mass of 315.9 kDa per AMO ( $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ ).

<sup>c</sup> AMO purified in metal-free buffer (buffer A) contained the same amount of Cu and Fe, but only 0.5  $\pm$  0.1 Zn atoms per AMO.

## Figure legends

**Figure 1** SDS-PAGE stained for protein and corresponding fluorograms of  $^{14}\text{C}$ -labeled soluble and membrane protein of *N. europaea*. Lane 1: Protein molecular mass standards; Lane 2: Soluble protein (loaded with 150  $\mu\text{g}$ ); Lane 3: Fluorogram of soluble protein; Lane 4: Membrane protein (loaded with 150  $\mu\text{g}$ ); Lane 5: Fluorogram of membrane protein.

**Figure 2** Blue native polyacrylamide gel (BN-PAGE) stained for protein and corresponding fluorograms of  $^{14}\text{C}$ -labeled soluble, membrane and total protein (crude cell free extract) of *N. europaea*. Lane 1: Native molecular mass standards; Lane 2: Soluble protein; Lane 3: Fluorogram of soluble protein; Lane 4: Membrane protein; Lane 5: Fluorogram of membrane protein; Lane 6: Total protein; Lane 7: Fluorogram of total protein. Black arrow:  $^{14}\text{C}$ -labeled protein at  $283 \pm 22$  kDa. Each lane was loaded with 250  $\mu\text{g}$  protein. All  $^{14}\text{C}$ -labeled protein migrated during electrophoresis.

**Figure 3** SDS-PAGE of purified soluble AMO stained for protein (lane 2, loaded with 50  $\mu\text{g}$ ) and molecular mass standards (lane 1). The gel was prepared in the absence of  $\beta$ -mercaptoethanol. The AmoA, AmoB, and cytochrome  $c_1$  subunits were identified by Maldi-Tof analysis.

**Figure 4** X-band EPR spectra of purified soluble AMO. Air-oxidized AMO spectra were recorded at 50 K (A) and at 10 K (B). Cu(II) signal ( $g_{\perp} = 2.057$ ,  $g_{\parallel} = 2.24$ ) of air oxidized AMO at 50 K (C) and spectrum after reduction with sodium dithionite (D). (E, F): As (C) and (D), but with acetylene-bound AMO. The spectra have been normalized for better comparison. Operating parameters were as follows: modulation frequency 100 kHz; modulation amplitude 10 G; time constant 40 ms. The microwave frequency was 9,474 GHz and the microwave power was 10 mW.

**Figure 5** Visible absorption spectra of soluble AMO. AMO air-oxidized (thin line) or reduced with sodium dithionite (bold line). The concentration of purified AMO was 0.5  $\text{mg ml}^{-1}$  in buffer A.

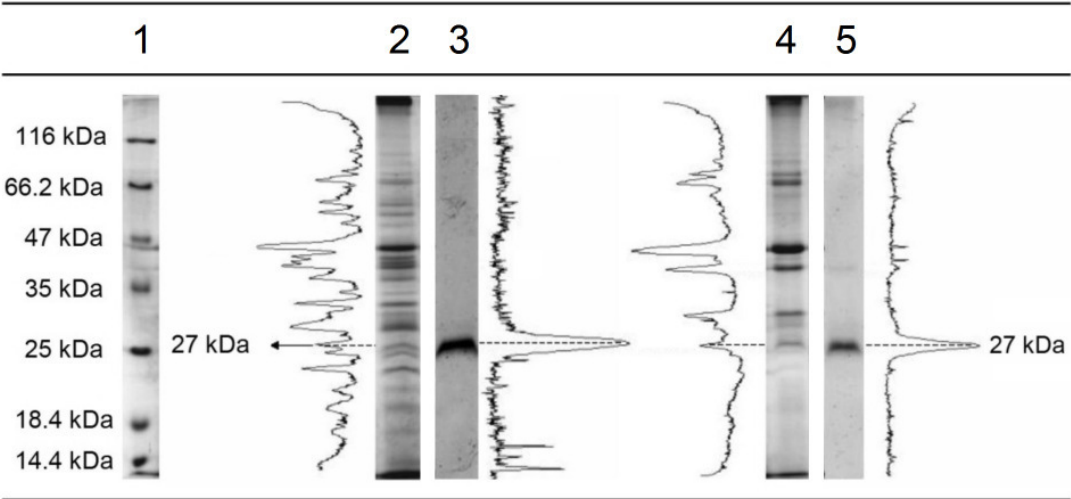


Figure 1

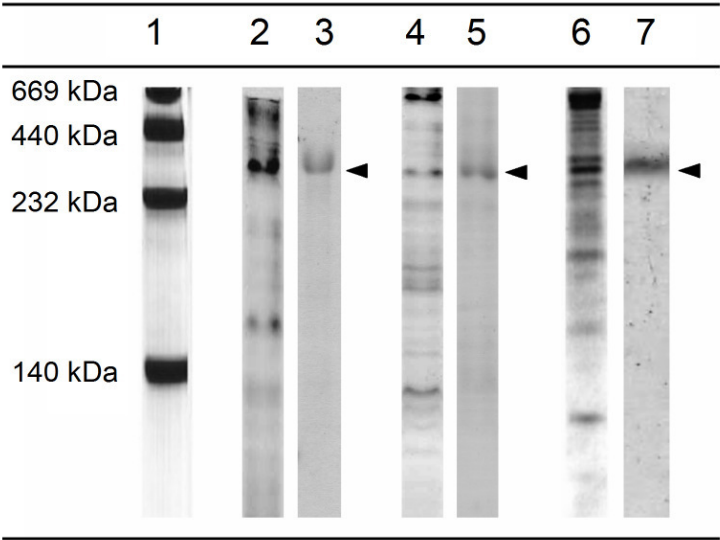
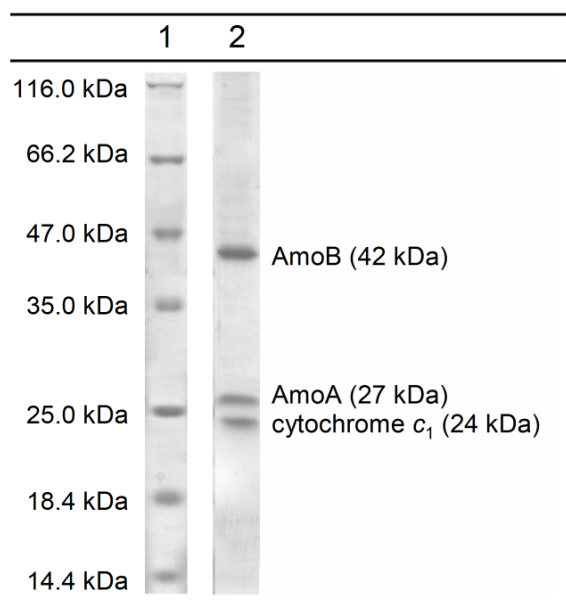
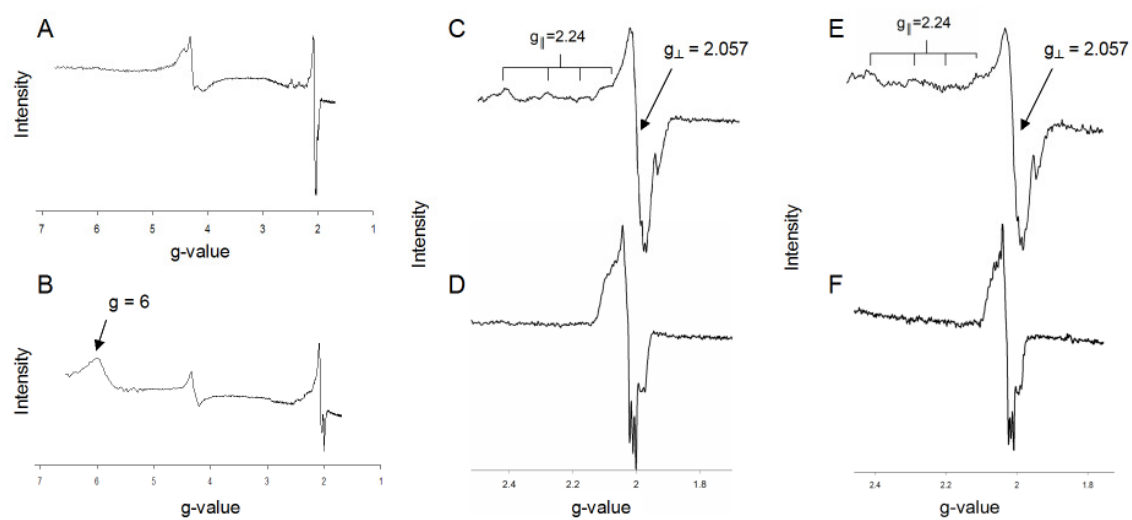
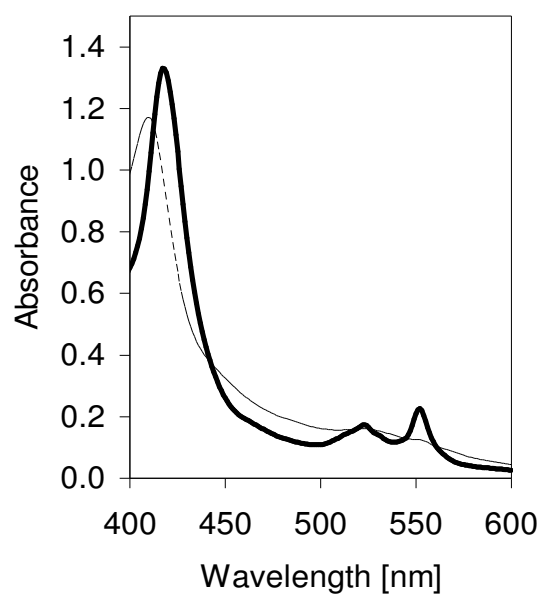


Figure 2

*Figure 3**Figure 4*

*Figure 5*



## II

Interaction of the mechanism-based inactivator acetylene with ammonia  
monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*

**Stefan Gilch<sup>†</sup>, Manja Vogel<sup>†</sup>, Matthias W. Lorenz<sup>‡</sup>, Ortwin Meyer<sup>†</sup>  
& Ingo Schmidt<sup>†,\*</sup>**

*Microbiology* **155**, 279-284  
(2009)

<sup>†</sup> Department of Microbiology, University of Bayreuth, 95447 Bayreuth, Germany

<sup>‡</sup> Department of Animal Ecology, University of Bayreuth, 95447 Bayreuth, Germany

\*Corresponding author.

Tel.: +49 921 552714; fax: +49 921 552727;

E-mail: ingo.schmidt1@uni-bayreuth.de

### **Darstellung des Eigenanteils:**

Mein Anteil an der Arbeit bestand aus der Fermentation von *N. europaea*, der Produktion des [<sup>14</sup>C]-Acetylen aus Ba<sup>14</sup>C<sub>2</sub>, der Inaktivierung und Markierung der AMO mit [<sup>14</sup>C]-Acetylen, der elektrophoretischen Auftrennung der AmoA-Untereinheit sowie der Fluorographie der entsprechenden Gele. Die Isolierung des Hexapeptids mittels HPLC und dessen massenspektroskopische Analyse erfolgte unter Anleitung von Dr. Matthias W. Lorenz am Lehrstuhl für Tierphysiologie der Universität Bayreuth. Der Eigenanteil beläuft sich auf ca. 60 %.

Verfasst wurde diese Publikation von Dr. Ingo Schmidt und mir.

## Interaction of the mechanism-based inactivator acetylene with ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*

Stefan Gilch,<sup>1</sup> Manja Vogel,<sup>1</sup> Matthias W. Lorenz,<sup>2</sup> Ortwin Meyer<sup>1</sup> and Ingo Schmidt<sup>1</sup>

### Correspondence

Ingo Schmidt  
ingo.schmidt1@uni-bayreuth.de

<sup>1</sup>Department of Microbiology, University of Bayreuth, 95447 Bayreuth, Germany

<sup>2</sup>Department of Animal Ecology, University of Bayreuth, 95447 Bayreuth, Germany

Received 27 August 2008

Revised 15 October 2008

Accepted 15 October 2008

The ammonia monooxygenase (AMO) of *Nitrosomonas europaea* is a metalloenzyme that catalyses the oxidation of ammonia to hydroxylamine. We have identified histidine 191 of AmoA as the binding site for the oxidized mechanism-based inactivator acetylene. Binding of acetylene changed the molecular mass of His-191 from 155.15 to 197.2 Da (+42.05), providing evidence that acetylene was oxidized to ketene (CH<sub>2</sub>CO; 42.04 Da) which binds specifically to His-191. It must be assumed that His-191 is part of the acetylene-activating site in AMO or at least directly neighbours this site.

## INTRODUCTION

Under oxic growth conditions *Nitrosomonas europaea* obtains energy by oxidation of ammonia via hydroxylamine to nitrite (Rees & Nason, 1966; Hooper *et al.*, 1997). The formation of hydroxylamine is catalysed by ammonia monooxygenase (AMO), which is thought to be a heteromultimeric copper protein encoded by the *amoCAB* operon (Dua *et al.*, 1979; Anderson & Hooper, 1983; Hyman & Wood, 1985; Hyman & Arp, 1993; Hooper *et al.*, 1997; Chain *et al.*, 2003); AmoA and AmoB were shown to co-purify (McTavish *et al.*, 1993). Much of what is known about the catalytic activity of AMO originates from biochemical studies with intact bacteria or subcellular fractions, and was deduced from the very similar process of methane oxidation by (particulate) methane monooxygenase, (p)MMO. Acetylene (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) is an irreversible inhibitor of ammonia oxidation in *Nitrosomonas* (Dua *et al.*, 1979; Anderson & Hooper, 1983; Hyman & Wood, 1985; Schmidt *et al.*, 2001), but has no effect on hydroxylamine oxidation at concentrations sufficient to completely inactivate ammonia oxidation (Hynes & Knowles, 1978). Acetylene has also been shown to be an inhibitor of other catalytically active monooxygenases (Hynes & Knowles, 1978; Prior & Dalton, 1985a; Zahn & DiSpirito, 1996; Yeager *et al.*, 1999). In AMO, acetylene binds to the 27 kDa AmoA subunit (Hyman & Arp, 1992). It was proposed that acetylene specifically inactivates catalytically active AMO as a result of an attempted oxidation of the triple bond of acetylene, forming a reactive intermediate that binds to an amino acid in or near the acetylene-activating site of AMO

(Hynes & Knowles, 1978; Hyman & Wood, 1985). Even after denaturation of AMO, acetylene (or an acetylene derivative) remains bound to the AmoA subunit. Hence, acetylene has to bind directly to the protein, and binding to a metal atom can be excluded, because metals are liberated from proteins upon denaturation. Nevertheless, the mechanism of acetylene inactivation and its binding site in AMO are unknown.

Soluble and particulate methane monooxygenases (sMMO, pMMO) catalyse the oxidation of methane to methanol. Interestingly, sMMO, pMMO and AMO are able to oxidize both ammonia and methane, although ammonia supports growth only of nitrifiers and methane only that of methanotrophs (Bedard & Knowles, 1989). As during ammonia oxidation, incorporation of one oxygen atom from O<sub>2</sub> into a non-activated C–H bond of methane (AMO: N–H bond of ammonia) is catalysed by sMMO and pMMO and the second oxygen atom is reduced to water (Lipscomb, 1994). It was suggested that a dinuclear ferrous cluster in sMMO (Dalton *et al.*, 1993) co-ordinates and activates oxygen. In pMMO a dinuclear or trinuclear copper centre (Lieberman & Rosenzweig, 2005a, b; Lieberman *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Chan & Yu, 2008) or a dinuclear iron centre (Martinho *et al.*, 2007) were proposed as catalytic centres. The resulting metal oxenoid species might then abstract a hydrogen atom from the substrate, leading to a deprotonated substrate intermediate and a metal-bound hydroxyl moiety. Rebinding of the hydroxyl could then yield the product (Nesheim & Lipscomb, 1996). Because AMO and pMMO are similar on the genetic, protein and functional level such a reaction mechanism was also proposed for the copper-containing monooxygenase AMO (Hooper & Terry, 1973; Stirling &

Abbreviations: AMO, ammonia monooxygenase; pMMO and sMMO, particulate and soluble methane monooxygenase.



S. Gilch and others

Dalton, 1977; Prior & Dalton, 1985b; Shears & Wood, 1985; Ensign *et al.*, 1993; Zahn *et al.*, 1996; Lieberman & Rosenzweig, 2005a).

The present study started from the assumption that acetylene, or rather an activated acetylene derivative, binds to a specific amino acid of AmoA. We have identified ketene as the product of acetylene activation at AMO and His-191 in AmoA as the binding site for ketene.

## METHODS

**Organism and growth conditions.** Stock cultures of *N. europaea* (ATCC 19718) were grown aerobically in 1 l Erlenmeyer flasks containing 400 ml mineral medium (Schmidt & Bock, 1997). Cultures were grown in the dark at 28 °C with shaking at 50 r.p.m. Cultures in the late exponential growth phase were used to inoculate a 30 l fermenter (Braun). Biomass was produced under discontinuous conditions with 20 l mineral medium supplemented with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . The medium was stirred at 50–200 r.p.m. and aerated with  $0.2\text{--}0.8\text{ l air min}^{-1}$  to maintain a dissolved oxygen concentration of  $5 \pm 0.2\text{ mg l}^{-1}$ . The temperature was 28 °C and the pH value was kept at 7.3 [20% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ]. Bacteria were harvested in the late exponential growth phase at a culture density of  $2 \times 10^8 \pm 3 \times 10^7\text{ cells ml}^{-1}$ , concentrated by cross-flow filtration (Haemoflow HF80S, Fresenius Medical Care), and sedimented by low-speed centrifugation. The sediment was washed twice by centrifugation in mineral medium without ammonium.

**Production of [ $^{14}\text{C}$ ]acetylene and  $^{14}\text{C}$ -labelled AMO.** Acetylene was produced from barium carbide ( $\text{BaC}_2$ ) according to Hyman & Arp (1990) in a closed glass bottle upon addition of water, dissolved in DMSO, which was placed in a second compartment of the bottle, and stored at  $-80\text{ °C}$ .  $\text{Ba}^{14}\text{C}_2$  ( $108\text{ mCi mmol}^{-1}$ , 3996 MBq  $\text{mmol}^{-1}$ ; Biotrend) was composed of  $\text{Ba}^{14,14}\text{C}_2$ ,  $\text{Ba}^{14,12}\text{C}_2$  and  $\text{Ba}^{12,12}\text{C}_2$  such that on average one carbon per  $\text{BaC}_2$  was a  $^{14}\text{C}$  isotope. To produce [ $^{14}\text{C}$ ]acetylene, 90% unlabelled  $\text{BaC}_2$  was mixed with 10%  $^{14}\text{C}$ -labelled  $\text{BaC}_2$ . Hence, the [ $^{14}\text{C}$ ]acetylene produced was composed of about 92.5% [ $^{12,12}\text{C}$ ]acetylene (26.04 Da), 5.0% [ $^{14,12}\text{C}$ ]acetylene (28.04 Da) and 2.5% [ $^{14,14}\text{C}$ ]acetylene (30.04 Da). Throughout this paper the term [ $^{14}\text{C}$ ]acetylene is used for this mixture.

To label AMO, fresh *N. europaea* cells (1 g) suspended in mineral medium without ammonium (4 ml) were transferred into a 25 ml serum flask sealed with a butyl rubber stopper.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was added from a 1 M stock solution to a final concentration of 10 mM and acetylene from  $2.3\text{ }\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]acetylene solution in DMSO to a final concentration of  $5.8\text{ nM}$  ( $63\text{ }\mu\text{Ci}$ ,  $2.3\text{ MBq}$ ). Bacteria were incubated for 1 h at 28 °C on a reciprocal shaker at 40 r.p.m. Labelling (inhibition) of AMO was considered complete when the nitrite concentration remained constant for 10 min. To remove unbound acetylene, bacteria were washed five times by centrifugation in  $50\text{ mM K}_2\text{HPO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  buffer (pH 7.3).

**Electrophoresis.** Protein concentration was estimated by the biuret assay (Bonner & Laskey, 1974) after solubilizing protein in 3 M NaOH for 30 min at 60 °C and removal of insoluble material by centrifugation (10 000 g for 5 min). BSA was employed for standardization. Denaturing PAGE (SDS-PAGE) was performed in a Mini-Protean II cell vertical gel electrophoresis chamber (Bio-Rad) on 12% gels according to Laemmli (1970) at 10–30 mA for about 14 h. Prior to loading, protein samples (100  $\mu\text{g}$  protein) were supplemented with an equal volume of buffer containing 125 mM Tris/HCl, 20% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 2% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol and 0.008%

(w/v) bromophenol blue. To prevent temperature-dependent aggregation of AmoA (Hyman & Arp, 1993), samples were incubated for 10 min at room temperature, centrifuged (10 min at 8000 g) and loaded onto the gels. Molecular mass standards (PepLab) were included on each gel to determine the apparent molecular masses of the polypeptides. Gels were stained with 0.1% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250 in aqueous solution with 5% (v/v) acetic acid and 25% (v/v) methanol. To analyse peptides smaller than 30 kDa, Tricine-SDS-PAGE was applied according to Schagger & von Jagow (1987).

**Scintillation autoradiography (fluorography) of  $^{14}\text{C}$ -labelled polypeptides.** Gels stained for protein were destained, water was replaced by DMSO, and gels were soaked in 4 vols 20% (w/w) 2,5-diphenyloxazol (PPO) in DMSO for 3 h. PPO in the gels was crystallized by immersion in 20 vols cold water for 1 h. Gels were then dried on Whatman filter paper (vacuum, 1 h at 80 °C) and placed in an X-ray cassette with a high-performance chemoluminescence film (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences). The cassette was stored at  $-80\text{ °C}$  for 10–14 days before developing the autoradiograph.

**Identification of AmoA.** Polypeptides after SDS-PAGE were prepared and then analysed by MALDI-TOF mass spectrometry as described before (Schmidt *et al.*, 2004). Polypeptides were identified via peptide mass fingerprinting (Mascot 1.7.1) with calculated  $m/z$  values from the *N. europaea* genome database. The significance of identification was evaluated by calculating the probability-based Mowse scores (Schmidt *et al.*, 2004).

**Enzymic and chemical protein cleavage.**  $^{14}\text{C}$ -labelled AmoA after Tricine-SDS-PAGE was cut from the gel and eluted in an electro-eluter equipped with a dialysis membrane (cut-off 10 kDa) applying a buffer containing 14% (w/v) glycine, 1% (w/v) SDS, 0.3% (w/v) Tris/HCl. The eluter was operated at 50 mA for 3.5 h at 4 °C. The buffer was then replaced by the same buffer but without SDS and elution was continued for 2 h. Eluted AmoA was concentrated to  $1\text{ mg ml}^{-1}$  by freeze-drying and the solution was immediately digested or stored at  $-80\text{ °C}$ .

AmoA was digested with  $20\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  sequence-grade trypsin (Promega) or  $30\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  endoproteinase Pro-C (Sigma-Aldrich) for 10 h at room temperature. The digest was stopped by addition of  $1\text{ }\mu\text{l}$  0.1 M PMSF. Cyanogen bromide (Sigma-Aldrich) was used for AmoA cleavage according to Smith (1994). Cyanogen bromide was added in about 50-fold molar excess over the expected methionyl residues and samples were incubated for 24 h at room temperature. The digest was terminated by drying down under vacuum. The dried samples were resolved in Tris/HCl buffer (pH 7.4). Complete hydrolysis of peptides into amino acids was performed with hydrochloric acid. Peptide samples were transferred in tubes containing hydrochloric acid (6 M) in a nitrogen atmosphere and heated to  $110\text{ °C}$  for 24 h. After cleavage, samples were stored at  $-80\text{ °C}$ .

**Peptide and amino acid separation and identification.** For N-terminal sequencing, peptides were separated by Tricine-SDS-PAGE, blotted on a PVDF membrane and the amino acid sequence was analysed by Edman degradation (analysis done by SeqLab).

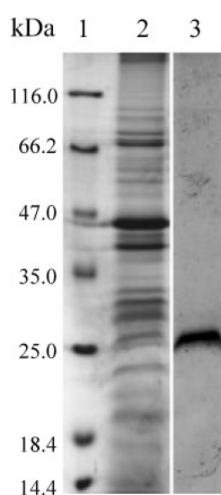
To identify the amino acid composition of the trypsin-cleaved  $^{14}\text{C}$ -labelled peptide, it was further digested with cyanogen bromide, and resulting peptides were separated on a Series 900 HPLC system (Jasco) using a  $250 \times 3\text{ mm}$  ReproSil-Pur ODS-3 column (Dr Maisch, Ammerbuch, Germany) and acetonitrile (ACN) in water containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) [10% (v/v) ACN for 2 min followed by a linear gradient of 10–80% ACN within 35 min at a flow rate of  $0.4\text{ ml min}^{-1}$ ]. Peptides were monitored at 214 nm and were collected separately. The fraction containing the  $^{14}\text{C}$ -labelled peptide

was identified by liquid scintillation counting (BETAmatic BASIC, Kontron Analytical) and then subjected to complete hydrochloric acid hydrolysis. The masses of the amino acids were analysed by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS) according to Eckerskorn *et al.* (1997). Amino acids were separated by reverse-phase HPLC using as mobile phase 5% (v/v) ACN and 0.1% (v/v) TFA in water followed by a linear gradient to 75% (v/v) ACN and 0.1% (v/v) TFA in water within 40 min (flow rate 0.5 ml min<sup>-1</sup>). Fractions corresponding to each amino acid were collected, concentrated under vacuum to dryness and resolved in methanol/water (50:50, v/v) for ESI-MS analysis. Molecular masses were determined using a Quattro-BQ triple quadrupole mass spectrometer (VG Biotech) equipped with a standard electrospray ionization source. Spectra were obtained with a capillary voltage of 3.5 kV (source temperature 80 °C). The average molecular mass values were calculated from *m/z* values in the charged ion distribution profiles of the multiply charged ions (Covey *et al.*, 1988).

## RESULTS AND DISCUSSION

### <sup>14</sup>C-labelling and identification of AmoA

[<sup>14</sup>C]Acetylene was added to ammonia-oxidizing *N. europaea* cells, where it selectively bound to the AmoA subunit of biologically functional AMO. <sup>14</sup>C-labelled AmoA was isolated from cell protein by SDS-PAGE and analysed by fluorography (Fig. 1). As expected, one <sup>14</sup>C-labelled polypeptide band was detectable with an apparent molecular mass of 27 kDa (predicted 32 kDa, Chain *et al.*, 2003) and the identity of the labelled polypeptide as AmoA was ascertained by MALDI-TOF analysis. The identification of AmoA (gi\_30248947, gi\_30250003) was highly significant, with a sequence coverage of 52% and an *E*-value of  $6 \times 10^{-98}$ .



**Fig. 1.** SDS-PAGE stained for protein and fluorogram of [<sup>14</sup>C]acetylene-treated *N. europaea* protein. Lane 1, protein molecular mass standards. Lane 2, Coomassie-stained protein. Lane 3, fluorogram of lane 2. The <sup>14</sup>C-labelled polypeptide at 27 kDa was identified as AmoA by MALDI-TOF.

### Identification of the [<sup>14</sup>C]acetylene-binding site in AmoA

<sup>14</sup>C-labelled AmoA was eluted from SDS-PAGE gels and aliquots of the solution were supplemented with trypsin, Pro-C or cyanogen bromide to digest the polypeptide. The resulting peptides were separated by Tricine-SDS-PAGE (Fig. 2).

Cleavage of AmoA with trypsin or Pro-C resulted in <sup>14</sup>C-labelled peptides with molecular masses of  $5.6 \pm 1.1$  kDa or  $2.6 \pm 0.9$  kDa, respectively (Fig. 2, peptides A and B). Application of cyanogen bromide produced three labelled peptides; the strongest signal in the fluorogram originated from the smallest  $4.5 \pm 1.0$  kDa <sup>14</sup>C-labelled peptide (Fig. 2, peptide C). The amount of larger <sup>14</sup>C-labelled peptides increased when digestion with cyanogen bromide was performed for a shorter period of time (12 or 18 h). Therefore, peptide C represents the <sup>14</sup>C-labelled AmoA fragment after complete cleavage and signals at higher molecular masses originate from incompletely cleaved peptides. The observation that complete cleavage of AmoA with trypsin, Pro-C or cyanogen bromide always resulted in one <sup>14</sup>C-labelled peptide provided evidence that binding of [<sup>14</sup>C]acetylene occurs at a certain part of the AmoA subunit.

Other proteases were tested for digestion of AmoA as well, but cleavage did not result in protein fragments appropriate for identification of the acetylene-binding site. Application of Asp-N, Glu-C, and Lys-C produced <sup>14</sup>C-labelled peptides of more than 10 kDa and after cleavage with chymotrypsin the <sup>14</sup>C-labelled peptide was too small to be separated by Tricine-SDS-PAGE.

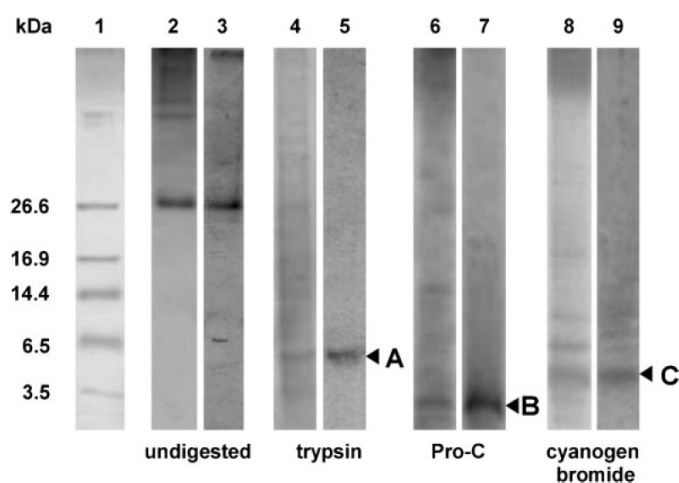
The [<sup>14</sup>C]acetylene-binding peptides A to C (Fig. 2) were sequenced (Table 1, sequences A to C). As controls the same peptides, but without bound acetylene, were blotted from Tricine-SDS-PAGE and also subjected to N-terminal amino acid sequencing.

The sequences of labelled and unlabelled peptides A and B were identical, but in the <sup>14</sup>C-labelled peptide C, His-191 could not be identified. The amino acid at this position had a significantly different retention time compared to histidine when analysed by HPLC during Edman degradation. In Fig. 3 the sequences of the three identified peptides are marked in the AmoA amino acid sequence. Because all three peptides were <sup>14</sup>C-labelled (Fig. 2), acetylene has to be bound to a part of AmoA where the sequences of peptides A, B and C overlap. The common amino acid sequence of these peptides is G<sub>190</sub>HLYVR. The modified mass of His-191 and the overlapping sequences of the three peptides provided the first evidence for His-191 as the acetylene-binding site in AmoA.

### Identification and mass analysis of the <sup>14</sup>C-labelled amino acid in AmoA

To prepare the <sup>14</sup>C-labelled peptide with the amino acid sequence G<sub>190</sub>HLYVR, AmoA was digested with trypsin

S. Gilch and others



**Fig. 2.** Tricine-SDS-PAGE stained for protein and fluorogram of AmoA (lanes 2, 3), AmoA digested with trypsin (lanes 4, 5), Pro-C (lanes 6, 7) or cyanogen bromide (lanes 8, 9), and protein molecular mass standards (lane 1). Coomassie-stained protein is shown in lanes 2, 4, 6 and 8, and corresponding fluorograms in lanes 3, 5, 7 and 9. The fluorograms after trypsin or Pro-C cleavage (lanes 5, 7) show one  $^{14}\text{C}$ -labelled peptide (A, B) and after cleavage with cyanogen bromide (lane 9) the smallest  $^{14}\text{C}$ -labelled peptide gave the strongest signal (C). Weaker signals at higher molecular masses (lane 9) represent  $^{14}\text{C}$ -labelled peptides after incomplete cleavage.

and cyanogen bromide. The  $^{14}\text{C}$ -labelled peptide was then purified by HPLC and subjected to complete hydrolysis with hydrochloric acid. The molecular masses of the resulting amino acids were analysed by mass spectrometry. The results are given in Table 2.

The expected molecular masses of five amino acids (Gly, Leu, Tyr, Val, Arg) of the hexapeptide were identifiable after hydrolysis, but the molecular mass of histidine (155.15 Da) was not detectable. Instead a molecular mass of 197.2 Da (molecular mass of histidine plus 42.05) was measured. The six amino acid samples were subjected to liquid scintillation counting. Only the sample containing the modified histidine was radioactive, confirming His-191 as binding site for a  $^{14}\text{C}$ -labelled acetylene derivative with a molecular mass of 42.05 Da.

The sum of the molecular masses of the six amino acids (Table 2) is 876.1 Da. Subtracting a molecular mass of 90 Da (5  $\text{H}_2\text{O}$ ; five peptide bonds), a molecular mass of

786.1 Da has to be expected for the  $^{14}\text{C}$ -labelled hexapeptide. In fact, for the purified hexapeptide a molecular mass of 786.1 Da was measured (as well as masses of 788.1 and 790.1 Da according to the isotope balance of the acetylene used). This result provides evidence that the treatment with hydrochloric acid hydrolysed the hexapeptide, but a further chemical modification of the amino acids including the histidine-acetylene derivative did not occur.

The histidine-acetylene derivative formed had molecular masses of 197.2, 199.2 and 201.2 Da. The sum of the molecular masses of histidine (155.15 Da) plus [ $^{14}\text{C}$ ]acetylene ( $^{12,12}\text{C}$ , 26.04;  $^{14,12}\text{C}$ , 28.04; and  $^{14,14}\text{C}$ , 30.04 Da) would be too small to explain the observed molecular mass of the histidine-acetylene derivative (Table 2). In general, monooxygenases introduce an oxygen atom into their substrate and the oxidation of acetylene by AMO obviously results in an activated acetylene derivative (intermediate) which then binds

**Table 1.** N-terminal sequences of  $^{14}\text{C}$ -labelled peptides after cleavage with trypsin (peptide A), Pro-C (peptide B) and cyanogen bromide (peptide C)

As control, peptides without bound acetylene were sequenced. The amino acids after Edman degradation were identified by their retention time during HPLC. Lysine and leucine as well as glutamine and threonine had the same retention time and discrimination between these amino acids was not possible. The non-expected amino acids according to the AMO sequence are indicated by small letters. The subscript after the first amino acid indicates the position of the amino acid in the AmoA sequence. X, amino acid could not be identified.

| Peptide | Labelled with acetylene | N-terminal sequence                               |
|---------|-------------------------|---|
| A       | +                       | N <sub>145</sub> -W-L/k-V-T/q-A-L/k-V-G-G-G-F-F-G |
| A       | -                       | N <sub>145</sub> -W-L/k-V-T/q-A-L/k-V-G-G-G-F-F-G |
| B       | +                       | I <sub>176</sub> -V-V-E-G-T/q-L/k-L/k-S-M-A-D     |
| B       | -                       | I <sub>176</sub> -V-V-E-G-T/q-L/k-L/k-S-M-A-D     |
| C       | +                       | G <sub>190</sub> -X-L/k-Y-V-R-T/q-G-T/q-P-E       |
| C       | -                       | G <sub>190</sub> -H-L/k-Y-V-R-T/q-G-T/q-P-E       |

121 INFVTPGIML PGALMLDFTL YLTRNWLVT**A** LVGGGFFGLL  
 161 FYPGNWPIFG PTHLP**B**IVVEG TLLSMADYMG HLYV**C**RTGTPE  
 201 YVRHIEQGSL RTFGGHTTVI AAFSAFVSM LMFTVWWYLG

**Fig. 3.** Amino acid sequences of peptides after cleavage of AmoA with trypsin (A; peptide underlined with a black bar), Pro-C (B; peptide underlined with a white bar), or cyanogen bromide (C; peptide underlined with a grey bar). The amino acid sequence of AmoA from amino acids 121 to 240 is diagrammed. Sequenced N-termini are indicated with bold letters. C-termini were determined according to the cleavage characteristics of trypsin, Pro-C and cyanogen bromide. All three  $^{14}\text{C}$ -labelled peptide sequences overlap in the sequence G<sub>190</sub>HLYVR, providing evidence that the [ $^{14}\text{C}$ ]acetylene-binding site is located in this hexapeptide.

covalently to His-191 of AmoA (Table 2, Fig. 3). Fomina *et al.* (2002) and Chan *et al.* (2004) suggested a mechanism for suicide inactivation of pMMO by acetylene, where acetylene reacts with an activated (reduced) copper centre initially forming a ketene, which then further reacts with a nucleophile at the active site. Histidine was proposed as suitable residue for binding ketene (Chen & Chan, 2006; Chen *et al.*, 2007). Due to the isotope composition of the [ $^{14}\text{C}$ ]acetylene used in this study, its oxidation to a ketene results in molecular masses of 42.04 ([ $^{12,12}\text{C}$ ]ketene), 44.04 ([ $^{14,12}\text{C}$ ]ketene) and 46.04 ([ $^{14,14}\text{C}$ ]ketene) Da. Consequently, histidine-ketene derivatives with molecular masses of 197.2, 199.2 and 201.2 Da [mass of histidine (155.15) plus 42.05, 44.05 or 46.05 Da] have to be expected and were in fact measured when analysing the His-191 derivative (Table 2).

**Table 2.** Molecular masses of amino acids in the acetylene-binding peptide G<sub>190</sub>HLYVR

The hexapeptide was prepared via combined cleavage of AmoA with trypsin and cyanogen bromide and was then completely hydrolysed with hydrochloric acid. The molecular masses are listed in ascending order; the amino acids were assigned according to their molecular masses.

| No. | Molecular mass (Da) | Amino acid |
|-----|---------------------|------------|
| 1   | 75.1 ± 0.5          | G          |
| 2   | 117.2 ± 0.4         | V          |
| 3   | 131.2 ± 0.3         | L          |
| 4   | 174.2 ± 0.4         | R          |
| 5   | 181.2 ± 0.4         | Y          |
| 6   | 197.2* ± 0.2        | ?          |

\*In addition small amounts of molecular masses 199.2 and 201.2 Da were detectable. According to the isotope balance of the acetylene used (92.5% [ $^{12,12}\text{C}$ ]acetylene, 5.0% [ $^{14,12}\text{C}$ ]acetylene and 2.5% [ $^{14,14}\text{C}$ ]acetylene) the proportion of the masses 197.2, 199.2 and 201.2 Da was approximately 90:7:3.

The molar ratio between bound  $^{14}\text{C}$ -label and AmoA or hexapeptide, respectively, was approximately 1:1 (Figs 2 and 3, Table 2). [ $^{14}\text{C}$ ]Acetylene binds exclusively to AmoA, and within AmoA only the hexapeptide G<sub>190</sub>HLYVR, and more specifically His-191, was found to be  $^{14}\text{C}$ -labelled (Table 2). After activation [ $^{14}\text{C}$ ]acetylene apparently binds specifically to His-191 and does not diffuse away from the activation site, which would result in binding at random positions and in substoichiometric amounts of  $^{14}\text{C}$ -label at the hexapeptide and at His-191. It must be assumed that His-191 is part of the acetylene-activating site in AMO or at least directly neighbours this site. It can be expected that the activation of the substrate ammonia occurs at the same active (metal) site.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). We thank Peter Steenbakkers, Huub op den Camp and Mike Jetten, Radboud University Nijmegen for protein identification via MALDI-TOF and Matthias Schlotter for technical assistance.

## REFERENCES

- Anderson, K. K. & Hooper, A. B. (1983). O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O are each the source of one O in NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produced from NH<sub>3</sub> by *Nitrosomonas*; <sup>15</sup>N-NMR evidence. *FEBS Lett* **164**, 236–240.
- Bedard, C. & Knowles, R. (1989). Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol Rev* **53**, 68–84.
- Bonner, W. M. & Laskey, R. A. (1974). A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem* **46**, 83–88.
- Chain, P., Lamerdin, J., Larimer, F., Regala, W., Lao, V., Land, M., Hauser, L., Hooper, A., Klotz, M. & other authors (2003). Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* **185**, 2759–2773.
- Chan, S. I. & Yu, S. S. (2008). Controlled oxidation of hydrocarbons by the membrane-bound methane monooxygenase: the case for a tricopper cluster. *Acc Chem Res* **41**, 969–979.
- Chan, S. I., Chen, K. H.-C., Yu, S. S.-F., Chen, C.-L. & Kuo, S. S.-J. (2004). Toward delineating the structure and function of the particulate methane monooxygenase from methanotrophic bacteria. *Biochemistry* **43**, 4421–4430.
- Chen, P. P. & Chan, S. I. (2006). Theoretical modeling of the hydroxylation of methane as mediated by the particulate methane monooxygenase. *J Inorg Biochem* **100**, 801–809.
- Chen, P. P., Yang, R. B., Lee, J. C. & Chan, S. I. (2007). Facile O-atom insertion into C–C and C–H bonds by a trinuclear copper complex designed to harness a singlet oxene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14570–14575.
- Covey, T. R., Bronner, R. F., Shushan, B. I. & Henion, J. (1988). The determination of proteins, oligonucleotide and peptide molecular weights by ion spray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2**, 249–256.
- Dalton, H., Wilkins, P. C. & Jiang, Y. (1993). Mechanistic pathways in soluble methane mono-oxygenase. *Biochem Soc Trans* **21**, 749–752.

S. Gilch and others

- Dua, R. D., Bhandari, B. & Nicholas, D. J. D. (1979). Stable isotope studies on the oxidation of ammonia to hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Lett* **106**, 401–404.
- Eckerskorn, C., Strupat, K., Kellermann, J., Lottspeich, F. & Hillenkamp, F. (1997). High-sensitivity peptide mapping by micro-LC with on-line membrane blotting and subsequent detection by scanning-IR-MALDI mass spectrometry. *J Protein Chem* **16**, 349–362.
- Ensign, S. A., Hyman, M. R. & Arp, D. J. (1993). *In vitro* activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. *J Bacteriol* **175**, 1971–1980.
- Fomina, L., Vazquez, B., Tkatchouk, E. & Fomine, S. (2002). The Glaser reaction mechanism. A DFT study. *Tetrahedron* **58**, 6741–6747.
- Hooper, A. B. & Terry, K. R. (1973). Specific inhibitor of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J Bacteriol* **115**, 480–485.
- Hooper, A. B., Vannelli, T., Bergmann, D. J. & Arciero, D. M. (1997). Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**, 59–67.
- Hyman, M. R. & Arp, D. J. (1990). The small-scale production of [ $^{14}\text{C}$ ]acetylene from  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ : application to labeling of ammonia monooxygenase in autotrophic nitrifying bacteria. *Anal Biochem* **190**, 348–353.
- Hyman, M. R. & Arp, D. J. (1992).  $^{14}\text{C}_2\text{H}_2$ - and  $^{14}\text{CO}_2$ -labeling studies of the *de novo* synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. *J Biol Chem* **267**, 1534–1545.
- Hyman, M. R. & Arp, D. J. (1993). An electrophoretic study of the thermal-dependent and reductant-dependent aggregation of the 28 kDa component of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *Electrophoresis* **14**, 619–627.
- Hyman, M. R. & Wood, P. M. (1985). Suicidal inactivation and labelling of ammonia monooxygenase by acetylene. *Biochem J* **227**, 719–725.
- Hynes, R. K. & Knowles, R. (1978). Inhibition by acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol Lett* **4**, 319–321.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lieberman, R. L. & Rosenzweig, A. C. (2005a). Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* **434**, 177–182.
- Lieberman, R. L. & Rosenzweig, A. C. (2005b). The quest for the particulate methane monooxygenase active site. *Dalton Trans* **3390**–3396.
- Lieberman, R. L., Kondapalli, K. C., Shrestha, D. B., Hakemian, A. S., Smith, S. M., Telser, J., Kuzelka, J., Gupta, R., Borovik, A. S. & other authors (2006). Characterization of the particulate methane monooxygenase metal centers in multiple redox states by X-ray absorption spectroscopy. *Inorg Chem* **45**, 8372–8378.
- Lipscomb, J. D. (1994). Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. *Annu Rev Microbiol* **48**, 371–399.
- Martinho, M., Choi, D. W., Dispirito, A. A., Antholine, W. E., Semrau, J. D. & Münck, E. (2007). Mössbauer studies of the membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* Bath: evidence for a diiron center. *J Am Chem Soc* **129**, 15783–15785.
- McTavish, H., Fuchs, J. A. & Hooper, A. B. (1993). Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* **175**, 2436–2444.
- Nesheim, J. C. & Lipscomb, J. D. (1996). Large kinetic isotope effects in methane oxidation catalyzed by methane monooxygenase: evidence for C–H bond cleavage in a reaction cycle intermediate. *Biochemistry* **35**, 10240–10247.
- Prior, S. D. & Dalton, H. (1985a). Acetylene as a suicide substrate and active site probe for methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath): inhibitor of methane-oxidising activity. *FEMS Microbiol Lett* **29**, 105–109.
- Prior, S. D. & Dalton, H. (1985b). The effect of copper ions on membrane content and methane monooxygenase activity in methanol-grown cells of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J Gen Microbiol* **131**, 155–163.
- Rees, M. & Nason, A. (1966). Incorporation of atmospheric oxygen into nitrite formed during ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Biochim Biophys Acta* **113**, 398–401.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368–379.
- Schmidt, I. & Bock, E. (1997). Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas europaea*. *Arch Microbiol* **167**, 106–111.
- Schmidt, I., Bock, E. & Jetten, M. S. M. (2001). Ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* with  $\text{NO}_2$  as oxidant is not inhibited by acetylene. *Microbiology* **147**, 2247–2253.
- Schmidt, I., Steenbakkers, P. J. M., op den Camp, H. J. M., Schmidt, K. & Jetten, M. S. M. (2004). Physiologic and proteomic evidence for a role of nitric oxide in biofilm formation by *Nitrosomonas europaea* and other ammonia oxidizers. *J Bacteriol* **186**, 2781–2788.
- Shears, J. H. & Wood, P. M. (1985). Spectroscopic evidence for a photosensitive oxygenated state of ammonia monooxygenase. *Biochem J* **226**, 499–507.
- Smith, B. J. (1994). Chemical cleavage of proteins. In *Basic Protein and Peptide Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 32, pp. 297–309. Edited by J. M. Walker. Totowa, NJ: Humana Press.
- Stirling, D. I. & Dalton, H. (1977). Effect of metal-binding agents and other compounds on methane oxidation by two strains of *Methylococcus capsulatus*. *Arch Microbiol* **114**, 71–76.
- Yeager, C. M., Bottomley, P. J., Arp, D. J. & Hyman, M. R. (1999). Inactivation of toluene 2-monooxygenase in *Burkholderia cepacia* G4 by alkynes. *Appl Environ Microbiol* **65**, 632–639.
- Zahn, J. A. & DiSpirito, A. A. (1996). Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J Bacteriol* **178**, 1018–1029.
- Zahn, J. A., Arciero, D. M., Hooper, A. B. & DiSpirito, A. A. (1996). Evidence for an iron center in the ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Lett* **397**, 35–38.

Edited by: D. J. Arp



### III

Electron paramagnetic studies of the copper and iron containing soluble ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*

**Stefan Gilch, Ortwin Meyer & Ingo Schmidt\***

eingereicht bei *BioMetals*

(2009)

Department of Microbiology, University of Bayreuth, 95447 Bayreuth, Germany

\*Corresponding author.

Tel.: +49 921 552714; fax: +49 921 552727;

E-mail: ingo.schmidt1@uni-bayreuth.

#### **Darstellung des Eigenanteils:**

Alle Experimente dieser Arbeit, mit Ausnahme der Bestimmung des Metallgehaltes durch ICP-MS, wurden von mir durchgeführt. Alle aufgeführten Abbildungen sind Resultate meiner Arbeit. Der Eigenanteil beläuft sich auf ca. 90 %.

Verfasst wurde diese Publikation von Dr. Ingo Schmidt und mir.

## Abstract

Soluble ammonia monooxygenase (AMO) from *Nitrosomonas europaea* was purified to homogeneity and metals in the active sites of the enzyme (Cu, Fe) were analyzed by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. EPR spectra were obtained for a type 2 Cu(II) site with  $g_{\parallel} = 2.24$ ,  $A_{\parallel} = 18.4$  mT and  $g_{\perp} = 2.057$  as well as for heme and non heme iron present in purified soluble AMO from *N. europaea*. A second type 2 Cu(II) EPR signal with  $g_{\parallel} = 2.29$ ,  $A_{\parallel} = 16.1$  mT and  $g_{\perp} = 2.03$  appeared in the spectrum of the ferricyanide oxidized enzyme and was attributed to oxidation of cuprous sites. Comparison of EPR-detectable  $\text{Cu}^{2+}$  with total copper determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) suggests that there are six paramagnetic  $\text{Cu}^{2+}$  and three diamagnetic  $\text{Cu}^{1+}$  per heterotrimeric soluble AMO (two paramagnetic and one diamagnetic Cu per  $\alpha\beta\gamma$ -protomer). An EPR signal at  $g = 6.01$ , caused by a high-spin iron, indicative for cytochrome bound iron, and a symmetrical isotropic signal at  $g = 4.31$ , characteristic of specifically bound  $\text{Fe}^{3+}$  was detectable. The binding of nitric oxide in the presence of reductant resulted in a ferrous  $S = 3/2$  signal, characteristic of a ferrous nitrosyl complex. Inactivation of soluble AMO with acetylene did neither diminish the ferrous signal nor the intensity of the  $\text{Cu}^{2+}$ -EPR signal.

**Key words:** *Nitrosomonas europaea*; soluble ammonia monooxygenase; electron paramagnetic resonance; copper and iron enzyme; nitrogen oxide; ferricyanide

## Introduction

*Nitrosomonas europaea* is a chemolithoautotrophic bacterium which obtains all of its energy from the oxidation of ammonia ( $\text{NH}_3$ ) to nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) (Dua et al. 1979; Andersson and Hooper 1983; Hyman and Wood 1985; Prosser 1989; Schmidt and Bock 1997; Arp and Stein



2003). The carbon requirement for growth is covered by fixation of CO<sub>2</sub> via the Calvin-Benson-Bassham (CBB) cycle. Ammonia oxidation by *N. europaea* is mediated by two different enzymes, ammonia monooxygenase (AMO), which catalyzes the oxidation of NH<sub>3</sub> to hydroxylamine (NH<sub>2</sub>OH) and hydroxylamine oxidoreductase (HAO), catalyzing the subsequent oxidation of NH<sub>2</sub>OH to NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Dua et al. 1979; Hollocher et al. 1981; Andersson and Hooper 1983). The second oxidation releases four electrons, two of which are required in ammonia oxidation and two of which are shuttled down the electron transport chain for cell growth and maintenance (Arp et al. 2002). *N. europaea* possesses a membrane bound AMO (McTavish et al. 1993; Hooper et al. 1997; Chain et al. 2003) and a soluble AMO (Schmidt and Bock 1998; Gilch et al. 2009a). *In vivo*, both membrane-bound and soluble AMO oxidize ammonia and are therefore assumed to contribute to energy conservation (Gilch et al. 2009a). Soluble AMO has been purified as a heterotrimeric metalloenzyme consisting of the three subunits AmoA, AmoB, and cytochrome *c*<sub>1</sub> (α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ<sub>3</sub>-subunit structure) with a molecular mass of about 317 kDa (Gilch et al. 2009a). Soluble AMO contains copper, iron and possibly zinc (Gilch et al. 2009a). Soluble AMO requires copper for activity and copper chelating agents (e. g. thiourea) inhibit ammonia oxidation activity (Loveless and Painter 1968; Ensign et al. 1993), so copper is proposed to participate in ammonia oxidation in an active site of the enzyme. Zahn and co-workers (1996) suggested the presence of non-heme iron in AMO based on EPR studies of subcellular fractions, but a direct correlation between iron content and AMO activity could not be shown.

Acetylene is a mechanism-based inactivator of AMO (Andersson and Hooper 1983; Hyman and Wood 1985; Schmidt et al. 2001; Gilch et al. 2009b). Addition of [<sup>14</sup>C]-acetylene to ammonia oxidizing *N. europaea* leads to an inhibition of ammonia oxidation activity (Hynes and Knowles 1978; Hyman and Wood 1985) due to a covalent attachment of acetylene to His 191 of AmoA (Gilch et al. 2009b). Acetylene also inhibits other monooxygenases like particulate methane monooxygenase (pMMO) from methanotrophic bacteria (Prior and Dalton 1985; Holmes et al. 1995; Balasubramanian and Rosenzweig 2007). Comparison of AMO and pMMO on genetic and functional level led to the assumption that location and co-ordination of the metal centers should be highly similar (McTavish et al. 1993; Holmes et al. 1995; Klotz and Norton 1998; Gilch et al. 2009a). Two metal centers, modeled as mononuclear and dinuclear copper sites, are located within the PmoB subunit. A third metal center, occupied by zinc, is located within the PmoC subunit (Lieberman and Rosenzweig 2005), but the site might contain copper *in vivo* (Balasubramanian and Rosenzweig 2007). The electron paramagnetic resonance spectrum of pMMO from

*M. capsulatus* (Bath) indicates the presence of a type 2 Cu(II) center ( $g_{\perp} = 2.057$ ,  $g_{\parallel} = 2.24$ , and  $|A_{\parallel}| = 172$  G), a weak high-spin iron signal ( $g = 6.01$ ), and a broad low-field ( $g = 12.5$ ) signal, characteristic for reduced binuclear Fe(II)-Fe(II) centers. (Zahn and Dispirito 1996; Hendrich and Debrunner 1989; Lipscomb 1994). Treatment of reduced pMMO with nitric oxide produces a ferrous-nitric oxide derivative with an electron spin of  $S=3/2$  which is similar to those of other non-heme iron proteins with  $g$  values near 4 and 2 (Arciero et al. 1983; Arciero and Lipscomb 1986; Nelson 1987).

In this study, the function of copper and iron in soluble AMO was examined and the redox chemistry of the metal centers, the influence of nitric oxide, ferricyanide and the mechanism based inhibitor acetylene on the metal centers was analyzed.

## Materials and methods

### Growth of bacterium

*Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718) was grown in a batch culture in mineral medium (Schmidt and Bock 1997) containing 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Cultures were incubated at 28°C stirring at 50-200 r. p. m. and aerated with 0.2-8 l air  $\text{min}^{-1}$  to maintain a oxygen concentration of  $5 \pm 0.2$  mg  $\text{l}^{-1}$ . The pH was kept constant at 7.3 [20 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ]. After 3 days, cells were harvested at  $2 \times 10^8 \pm 3 \times 10^7$  cells  $\text{ml}^{-1}$ , concentrated by cross-flow filtration (Haemoflow HF80S, Fresenius Medical Care), and sedimented by centrifugation. The cell sediment was washed twice with mineral medium without ammonium. Purity of cultures was checked by plating on complex solid media or in liquid cultures as well as by phase-contrast microscopy.

### Purification of soluble AMO

Cells were passed through a French pressure cell eight times with maximal pressure. The lysate was centrifuged at 8,000 x  $g$  for 20 min at 4°C to remove unbroken cells. The supernatant was centrifuged at 120,000 x  $g$  for 20 min at 4°C to prepare the soluble fraction. Soluble AMO was then purified 12-fold to homogeneity as described before (Gilch et al. 2009a) and transferred into a 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH 7.5, buffer A).

## Production of acetylene and acetylene inactivated AMO

Acetylene was produced from barium carbide ( $\text{BaC}_2$ ) according to Hyman and Arp (1990) and Gilch et al. (2009a). In a closed glass bottle acetylene was produced from  $\text{BaC}_2$  upon addition of water and was then dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO). To inactivate AMO, *N. europaea* cells (1 g) suspended in mineral medium without ammonium (4 ml) were transferred into a 25 ml-serum flask sealed with a butyl rubber stopper.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was added from a stock solution to a final concentration of 10 mM. After supplementing acetylene in DMSO bacteria were incubated at  $28^\circ\text{C}$  on a reciprocal shaker at 40 r. p. m.. Inactivation of soluble AMO was considered complete when nitrite concentration remained constant. Soluble acetylene inactivated AMO was purified as described above.

## Sample preparation for EPR spectroscopy

Potassium ferricyanide [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] was added from a 100 mM stock solution to purified soluble AMO in buffer A to a final concentration of 2 mM. Samples were then subjected to gelfiltration on a Sephadex G-25-packed disposable column to remove unbound metals, transferred into quartz EPR tubes (Wilma Lab Glass, Buena, USA) and frozen slowly in liquid  $\text{N}_2$ .

Reduced soluble AMO was produced by adding 1 mM ascorbate or 1 mM (10 mM) dithionite (DT) and 500  $\mu\text{M}$  methoxyphenazine methosulfate (MPMS) as mediator. Reduction was performed in an anaerobic chamber under an oxygen-free  $\text{N}_2$ -atmosphere. Samples were reduced for 10 min and then frozen slowly in liquid nitrogen. To detect mixed-valency di-iron clusters purified soluble AMO was placed in an EPR tube, which was evacuated and flushed with oxygen-free  $\text{N}_2$  several times to obtain anaerobic conditions. Ascorbate and MPMS were then added as anaerobic solutions and the sample was incubated 10 min prior to freezing and EPR measurements.

The nitric oxide derivatives of ascorbate and DT reduced soluble AMO were prepared by addition of nitric oxide to reduced soluble AMO under anaerobic conditions. Following formation of nitrosyl derivatives, the samples were transferred to quartz EPR tubes and frozen in liquid nitrogen as quickly as possible ( $< 2$  min).

Loosely bound bivalent metal ions were removed from soluble AMO by addition of  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  to a final concentration of 2 mM in buffer A. After incubation for 10 min the

sample was subjected to gelfiltration onto a Sephadex G-25-packed disposable column equilibrated with buffer A, to remove Cu-EDTA and excess of Na<sub>2</sub>-EDTA from the sample. An aliquot of soluble AMO was immediately transferred to quartz EPR tubes and frozen in liquid nitrogen. Remaining soluble AMO solution was supplemented with an appropriate CuCl<sub>2</sub> stock solution to a final concentration of 0.5 mM. To remove unbound Cu ions, the protein sample was loaded onto a Sephadex G-25-packed disposable column equilibrated with buffer A. Protein concentrations were determined before and after each gelfiltration to calculate the protein-metal ratio.

### EPR measurements

All X-band EPR-spectra were recorded on an EMX spectrometer (Bruker, EPR spectrometer ECS 106) with a helium cryostat (Oxford instruments, ESR 900 cryostat) under experimental conditions described by Hänzelmann and Meyer (1998) and Bray et al. (1983). Samples (200 µl) were placed in a finger dewar filled with liquid nitrogen and quickly transferred to the precooled measuring chamber of the spectrometer. The concentration of Cu<sup>2+</sup> in the sample was calculated by comparing the double spin integral with that of a 1 mM cupric perchlorate solution. The signal at  $g = 4.3$  was compared with a 1 mM transferrin standard to calculate the non-heme iron concentration. Operating parameters are outlined in figure legends.

### Metal ion analysis and protein assay

Metal ions (Cu, Fe, Zn) in purified soluble AMO were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Samples (250 µl with 4.4 mg AMO ml<sup>-1</sup>) were diluted in an equal volume of concentrated nitric acid and digested for 24 h at 110°C. Samples were diluted 40-fold with distilled water and the concentrations of metal ions were determined relative to standard solutions. Protein concentrations were determined by the biuret assay (Gornall et al. 1949).

## Results

Prior to EPR measurements, the metal content of soluble AMO as well as of acetylene inhibited soluble AMO was determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry. Isolated soluble AMO contains about 9.5 Cu, 3.9 Fe and 2.6 Zn atoms per molecule ( $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ -subunit composition, Table 1). Soluble AMO with bound acetylene has a significantly reduced Cu content (7.1 Cu atoms per soluble AMO), but the Fe and Zn content is unchanged. The covalent binding of acetylene (ketene) to His 191 of AmoA (Gilch et al. 2009b), obviously removed about 2-3 Cu atoms from their co-ordination site(s) (Table 1).

Table 1

Figure 1 shows the EPR spectrum of soluble AMO isolated from *N. europaea*. The EPR spectrum contains a high-spin Fe signal at  $g = 6.01$ , a symmetric isotropic ferric signal at  $g = 4.31$  and a type 2 Cu(II) signal with  $g_{\parallel} = 2.24$ ,  $A_{\parallel} = 18.4$  mT and  $g_{\perp} = 2.057$ . A high-spin Fe(III) signal at  $g = 6.01$  was already observed earlier analyzing membranes of *N. europaea* (Zahn et al. 1996). The type 2 Cu(II) signal indicates that metal ions in soluble AMO exist as active sites of electron or oxygen carriers. In pMMO of *M. capsulatus* (Bath) a similar type 2 Cu(II) signal with  $g_{\perp} = 2.057$ ,  $g_{\parallel} = 2.24$ , and  $|A_{\parallel}| = 172$  G was observed (Nguyen et al. 1994; Nguyen et al. 1996; Zahn and DiSpirito 1996)

Figure 1

Double spin integration of the type 2 Cu(II) signal and comparison to a cupric perchlorate standard indicated that 6.5  $\text{Cu}^{2+}$  ions are bound to soluble AMO (317 kDa;  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ ; Gilch et al. 2009a; Fig. 1, 2a). Taking into account, that ICP-MS analysis showed a total Cu content of 9.5 per soluble AMO ( $\text{mol mol}^{-1}$ , Table 1), soluble AMO contains three  $\text{Cu}^{1+}$  per native enzyme. Treatment of as-isolated soluble AMO with  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  reduced the  $\text{Cu}^{2+}$  content of the native enzyme from 6.5 to 3.1 (Fig. 2b). Thus 3.4  $\text{Cu}^{2+}$  ions could be removed from soluble AMO by treatment with EDTA. Higher EDTA concentrations up to 50 mM were not able to detach further  $\text{Cu}^{2+}$  ions from their co-ordination sites within soluble AMO. This result shows that about three  $\text{Cu}^{2+}$  ions are resistant towards complexation by EDTA. It might be possible that these  $\text{Cu}^{2+}$  ions are not located close to the surface, but buried inside the enzyme shielding them from EDTA. Removal of EDTA and addition of  $\text{CuCl}_2$  (0.5 mM) raised the

$\text{Cu}^{2+}$  content per soluble AMO to 4.1 (Fig. 2c). Hence, not all  $\text{Cu}^{2+}$  ions removed by EDTA can be reintroduced by the addition of  $\text{CuCl}_2$ . Application of  $\text{CuCl}_2$  up to 10 mM had no significant effect on the  $\text{Cu}^{2+}$  occupancy of soluble AMO. Two different scenarios might explain this observation: First it could be assumed that Cu-integration into soluble AMO must occur already before or during folding and assembling of the heterotrimeric protein complex. A second option is that Cu-integration requires the assistance of additional chaperons and/or Cu-chelataes, which are absent after purification of soluble AMO. EDTA treatment also affected the high spin iron signal at  $g = 6.01$  (Fig. 2, inlet). Addition of EDTA nearly diminishes the iron signal (Fig. 2b), and incubation of iron-free AMO in 0.1 mM  $\text{FeSO}_4$  solution reintroduced about 80% of the high-spin iron (Fig. 2c). This is surprising, because EDTA is not capable of removing heme-Fe out of its porphyrine co-ordination, and the  $g = 6.01$  signal should therefore not be affected by the addition of EDTA. The reason for the alteration of the  $g = 6.01$  signal upon treatment with EDTA still has to be examined.

### Figure 2

From about nine Cu ions co-ordinated within soluble AMO about three are in the  $\text{Cu}^{1+}$ -state. Purification and EPR spectroscopy was performed under oxic conditions indicating that the three  $\text{Cu}^{1+}$  ions are resistant towards oxidation by molecular oxygen. Supplementing as-isolated soluble AMO with potassium ferricyanide [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] lead to an almost complete oxidation of the  $\text{Cu}^{1+}$  ions (Fig. 3). Via double spin integration of the resulting type 2 Cu(II) signal a  $\text{Cu}^{2+}$  concentration of 8.8  $\text{Cu}^{2+}$  per molecule of soluble AMO was calculated, which equals the number of Cu atoms determined by ICP-MS (Table 1). In addition to the type 2 Cu(II) signal ( $g_{\parallel} = 2.24$ ,  $A_{\parallel} = 18.4$  mT and  $g_{\perp} = 2.057$ ; Fig. 3A) the fully oxidized enzyme exhibits a second EPR signal with  $g_{\parallel} = 2.29$ ,  $A_{\parallel} = 16.1$  mT and  $g_{\perp} = 2.03$  (Fig. 3B). Such signal is typically of  $\text{Cu}^{1+}$  sites oxidized by ferricyanide (Nguyen et al. 1998). Interestingly, the  $\text{Cu}^{1+}$  ions remain bound at the enzyme after being oxidized to  $\text{Cu}^{2+}$ . This fact provides evidence, that the  $\text{Cu}^{1+}$ -sites may function as redox active site, involved in either electron transfer or substrate conversion. Structural  $\text{Cu}^{1+}$  atoms would be detached from the enzyme upon oxidation (Blain et al. 2002).

### Figure 3

Nitric oxide (NO) has been commonly used to form EPR-active nitrosyl-iron complexes in some spectroscopically indistinguishable non-heme  $\text{Fe}^{3+}$  containing enzymes (Arciero et al. 1983; Nelson 1978; Zahn et al. 1996). Exposure of non-heme ferrous iron to NO can yield a species with an electron spin of  $S = 3/2$ . Based on this observation, EPR spectra of dithionite (DT)-reduced soluble AMO were recorded before and after treatment with NO. As obvious from Fig. 4B, a nitrosyl iron complex was formed resulting in a lower intensity of the isotropic signal at  $g = 4.31$ , and an intermediate spin ( $S = 3/2$ ) appeared at  $g = 4.01$  (isotropic nature) and  $g = 4.11$  (rhombic nature). The rhombic signal at  $g = 4.43$ , typical for protein coordinated  $\text{Fe}^{3+}$ , vanishes completely after treatment with NO, indicating that all  $\text{Fe}^{3+}$  ions of soluble AMO were capable of forming a nitrosyl iron complex.

The EPR spectrum of the nitrosyl iron complex derivative of soluble AMO from *N. europaea* is similar to that of pMMO from *Methylosinus trichosporium* OB3b (Takeguchi and Okura 2000), *Methylococcus capsulatus* (Bath) (Zahn and DiSpirito 1996), and to protocatechuate-4,5-dioxygenase from *Pseudomonas testosteroni* (Lipscomb et al. 1982; Arciero et al. 1986). Protocatechuate-4,5-dioxygenase is thought to have a mononuclear non-heme iron in the active site, capable of reacting with NO and thus providing Fe-species with a spin state of  $S = 3/2$  and  $g$  values around 4. However, it is still unclear whether  $\text{Fe}^{3+}$  plays a structural role on the tertiary folding of the protein or serves directly as electron transferring cluster or as an active site metal for substrate activation.

#### Figure 4

Purified soluble AMO contains about four iron atoms per molecule (Table 1). Three iron atoms are co-ordinated by the three Cyt  $c_1$ -subunits of native soluble AMO in a high spin state, resulting in the rhombic signal at  $g = 6.01$ . To determine, whether the remaining iron atom might belong to a possible di-iron cluster  $[\text{Fe(III)-Fe(III)}]$ , we attempted to evaluate conditions that would result in an EPR-visible mixed-valency form  $[\text{Fe(III)-Fe(II)}]$  of this type of cluster. Such a transition can be obtained after incubation of soluble AMO in the presence of the mediator MPMS and a reductant such as ascorbate or DT. This mixed-valency species normally has a strong  $S = 1/2$  EPR signal, with all  $g$ -values below  $g = 6$  (Andersson and Gräslund 1995). After reduction with ascorbate and MPMS such signal was not observed, but the type 2 Cu(II) signal decreased, resulting from a partially reduction of EPR-active  $\text{Cu}^{2+}$  to EPR-silent  $\text{Cu}^{1+}$  (Fig. 5a). Interestingly, there was a significant increase in the ferrous  $g = 4.31$  signal with respect to oxidized soluble AMO (compare Fig. 1 and Fig. 5). Coupling

of a paramagnetic  $\text{Fe}^{3+}$  iron with another paramagnetic metal can diminish both signals. Upon reduction of the coupling metal with ascorbate/MPMS turns it can turn into its diamagnetic state and the paramagnetic iron signal at  $g = 4.31$  increases (Fig. 5). Also the reduction of soluble AMO with DT/MPMS gave no indication for a mixed-valency di-iron cluster. In relation to the spectrum of ascorbate/MPMS reduced soluble AMO, the spectrum of DT reduced soluble AMO showed a further increased isotropic signal at  $g = 4.31$  (Fig. 5b). The sharpness and the isotropic nature of this signal is characteristic of specifically bound  $\text{Fe}^{3+}$  ions in an octahedral ligation environment (Hagen 1992). Thus an increased  $\text{Fe}^{3+}$  signal at  $g = 4.31$  upon reduction with ascorbate and DT indicates that a usually resting  $\text{Fe}^{3+}$  interacts magnetically with another metal-species, yielding a basically EPR-silent  $\text{Fe}^{3+}$  site. The magnetic behavior of  $\text{Fe}^{3+}$  in soluble AMO is similar to that of transferrin, indicating a comparable ligation environment including co-ordination by tyrosine. A participation of tyrosine in  $\text{Fe}^{3+}$  co-ordination in AMO is further supported by the finding that  $\text{Fe}^{3+}$  is not reduced by ascorbate/MPMS or DT/MPMS which is a typical feature of iron-tyrosinate proteins (Que 1983; Que and Ho 1996).

### Figure 5

The exposure of soluble AMO to 1 mM DT and 1 mM ascorbate in the presence of the mediator MPMS resulted in a reduced type 2 Cu(II) signal (Fig 5a,b). Complete reduction of all  $\text{Cu}^{2+}$  ions was observed upon addition of 10 mM DT under anaerobic conditions (Fig. 5c). The type 2 Cu(II) signal with  $g_{\parallel} = 2.24$  as well as the isotropic iron signal at  $g = 4.31$  are diminished upon supplementation of excess of DT. Similar data have been reported for the type 2 Cu(II) signal of pMMO from *M. capsulatus* (Bath) (Nguyen et al. 1994; Nguyen et al. 1996).

### Figure 6

Acetylene is a mechanism-based inhibitor of ammonia oxidation by soluble AMO and derivatizes the  $\alpha$ -subunit (AmoA) of the enzyme (Hynes and Knowles 1978; Prior and Dalton 1985; Zahn et al. 1996; Yeager et al. 1999; Gilch et al. 2009b). The EPR spectra of soluble AMO with and without bound acetylene were recorded (Fig. 6). The lack of a significant effect of derivatization by acetylene on the type 2 Cu(II) signal suggests that acetylene does not bind at or nearby an active  $\text{Cu}^{2+}$  site of the enzyme. However, acetylene inhibited soluble AMO co-ordinates about 2.4 Cu atoms less than uninhibited soluble AMO (Table 1). Hence,



acetylene might interact with or at an active site of the enzyme co-ordinating  $\text{Cu}^{1+}$  which is liberated upon acetylene binding. Considering that acetylene binds at His 191 of AmoA (Gilch et al. 2009b), the  $\text{Cu}^{1+}$  co-ordination site has to be located within the AmoA subunit of soluble AMO. Furthermore, acetylene inhibited soluble AMO exhibits a weak signal at  $g = 2$ , possibly originating from an organic radical, which might be formed upon binding of acetylene (Fig. 6).

### Figure 7

## Acknowledgement

This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). We thank Dr. Vitali Svetlitchnyi for helpful discussion and for excellent assistance performing the EPR experiments.

## References

- Andersson KK, Gräslund A (1995) Diiron-oxygen proteins. In: Sykes AG (ed) Advances in inorganic chemistry, vol. 43. Academic Press, Orlando, pp359-308
- Andersson KK, Hooper AB (1983)  $\text{O}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$  are each the source of one O in  $\text{NO}_2^-$  produced from  $\text{NH}_3$  by *Nitrosomonas*;  $^{15}\text{N}$ -NMR evidence. FEBS Lett 164:236-240
- Arciero DM, Lipscomb JD, Huynh BH, Kent TA, Münck E (1983) Evidence for direct substrate binding to the active site  $\text{Fe}^{2+}$  of extradiol dioxygenases. J Biol Chem 258:14981-14991
- Arciero DM, Lipscomb JD (1986) Binding of  $^{17}\text{O}$ -labeled substrate and inhibitors to protocatechuate 4,5-dioxygenase-nitrosyl complex. J Biol Chem 261:2170-2178
- Arp DJ, Stein LY (2003) Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. Crit Rev Biochem Mol Bio 38:471-495
- Arp DJ, Sayavedra-Soto LA, Hommes NG (2002) Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. Arch Microbiol 178: 250-255

- Balasubramanian R, Rosenzweig AC (2007) Structural and mechanistic insights into methane oxidation by particulate methane monooxygenase. *Acc Chem Res* 40: 573-580
- Blain I, Slama P, Giorgi M, Tron T, Réglie M (2002) Copper containing monooxygenases : enzymatic and biomimetic studies of the O-atom transfer catalysis. *Rev Mol Biotech* 90:95-112
- Bray RC, George GN, Lange R, Meyer O (1983) Studies by e.p.r. spectroscopy of carbon monoxide oxidases from *Pseudomonas carboxydovorans* and *Pseudomonas carboxydohydrogena*. *Biochem J* 211:687-694
- Chain PP, Lamerdin J, Larimer F, Regala W, Lao V, Land M, Hauser L, Hooper AB, Klotz MG et al (2003) Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* 185:2759-2773
- Dua RD, Bhandari B, Nicholas DJD (1979) Stable isotope studies on the oxidation of ammonia to hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Lett* 106:401-404
- Ensign SA, Hyman MR, Arp DJ (1993) *In vitro* activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. *J Bacteriol* 175:1971-1980
- Gilch S, Meyer O, Schmidt I (2009a) A soluble form of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *Biol. Chem.* Published online: DOI: 10.1515/BC.2009.085
- Gilch S, Vogel M, Lorenz MW, Meyer O, Schmidt I (2009b) Interaction of the mechanism-based inactivator acetylene with ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Microbiology* 115:279-284
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177:751-766
- Hagen WR (1992) EPR spectroscopy of iron-sulfur proteins. In: Sykes AG (ed) *Advances in inorganic chemistry*, vol. 38. Academic Press, Orlando. pp359-408
- Hänzelmann P, Meyer O (1998) Effect of molybdate and tungstate on the biosynthesis of CO dehydrogenase and the molybdopterin cytosine-dinucleotide-type of molybdenum cofactor in *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Eur J Biochem* 255:755-765
- Hendrich WP, Debrunner PG (1989) Integer-spin electron paramagnetic resonance of iron proteins. *Biophys. J.* 56:489-506
- Hollocher TC, Kumar S, Nicholas DJD (1981) Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*: definitive <sup>18</sup>O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *J Biol Chem* 256:10834-10836

- Holmes AJ, Costello A, Lidstrom ME, Murrell JC (1995) Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol Lett* 132:203-208
- Hooper AB, Vannelli T, Bergmann DJ, Arciero DM (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71:59-67
- Hyman MR & Wood PM (1985) Suicidal inactivation and labelling of ammonia monooxygenase by acetylene. *Biochem J* 227:719-725
- Hyman MR, Arp DJ (1990) The small-scale production of [U-<sup>14</sup>C]acetylene from Ba<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>: application to labeling of ammonia monooxygenase in autotrophic nitrifying bacteria. *Anal Biochem.* 190: 348-353
- Hynes RK, Knowles R (1978) Inhibition by acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol Lett* 4:319-321
- Klotz MG, Norton JM (1998) Multiple copies of ammonia monooxygenase (amo) operons have evolved under biased AT/GC mutational pressure in ammonia-oxidizing autotrophic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 168:303-311
- Lieberman RL, Rosenzweig AC (2005) Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* 434:177-182
- Lipscomb JD, Whittaker JW, Arciero DM (1982) Comparative studies of intra- and extradiol protocatechuate dioxyphases. In: Nizaju S, Yamamoto Y, Ishimura M, Coon L, Ernster L, Estabrook RW (eds) *Oxygenases and oxygen metabolism*. Academic Press, New York, pp27-38
- Lipscomb JD (1994) Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 48:371-399
- Loveless JE, Painter HA (1968) The influence of metal ion concentrations and pH value on the growth of a *Nitrosomonas* strain isolated from activated sludge. *J Gen Microbiol* 52:1-14
- McTavish H, Fuchs JA, Hooper AB (1993) Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* 175:2436-2444
- Nelson MJ (1987) The nitric oxide complex of ferrous soybean lipoxygenase-1. *J Biol Chem* 262:12137-12142
- Nguyen H-HT, Schiemke AK, Jacobs SJ, Hales BJ, Lidstrom ME, Chan SI (1994) The nature of the copper ions in the membranes containing the particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J Biol Chem* 269:14995-15005

- Nguyen H-HT, Nakagawa KH, Hedman B, Elliott SJ, Lidstrom ME, Hodgeson KOI, Chan SI (1996) X-ray absorption and EPR studies on the copper ions associated with the particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). J Am Chem Soc 118:12766-12776
- Nguyen H-HT, Elliott SJ, Yip JH-K, Chan SI (1998) The particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a novel copper-containing three-subunit enzyme. J Biol Chem 273:7957-7966
- Prior SD, Dalton H (1985) Acetylene as a suicide substrate and active site probe for methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). FEMS Microbiol Lett 29:105-109
- Prosser JI (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. Adv Microb Physiol 30:125-177
- Que L (1983) Metalloproteins with phenolate coordination. Coord Chem Rev 50:73-108
- Que L, Jo RYN (1996) Dioxygen activation by enzymes with mononuclear non-heme iron active sites. Chem Rev 96:2607-2624
- Schmidt I, Bock E (1997) Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. Arch Microbiol 167:106-111
- Schmidt I, Bock E (1998) Anaerobic ammonia oxidation by cell-free extracts of *Nitrosomonas eutropha*. Antonie van Leeuwenhoek. 73:271-278
- Schmidt I, Bock E, Jetten MSM (2001) Ammonia oxidation by *Nitrosomonas eutropha* with NO<sub>2</sub> as oxidant is not inhibited by acetylene. Microbiology 147:2247-2253
- Takeguchi M, Okura I (2000) Role of iron and copper in particulate methane monooxygenase of *Methylosinus trichosporium* OB3b. Catalysis Surveys 4:51-63
- Yeager CM, Bottomley PJ, Arp DJ, Hyman MR (1999) Inactivation of toluene 2-monooxygenase in *Burkholderia cepacia* G4 by alkynes. Appl Environ Microbiol 65:632-639
- Zahn JA, Arciero DM, Hooper AB, DiSpirito AA (1996) Evidence for an iron center in the ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. FEBS Lett 397:35-38
- Zahn JA, DiSpirito AA (1996) Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). J Bacteriol 178:1018-1029

## Tables

**Table 1** Metal content in the as-isolated soluble AMO and acetylene inhibited soluble AMO from *N. europaea*. Buffer: Metal content of the protein free phosphate buffer (buffer A). Soluble AMO in buffer: Metal content of soluble AMO and phosphate buffer (buffer A). Before metal analysis the soluble AMO samples were subjected to gel filtration. Data are average values of three replicated experiments ( $\pm$  SD).

| Metal   | AMO <sup>a</sup>                |                                 |                                 | Acetylene labeled AMO <sup>b</sup> |                                 |                                 |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|   | Cu                              | Fe                              | Zn                              | Cu                                 | Fe                              | Zn                              |
| Buffer ( $\mu$ M)                                       | 1.1 $\pm$ 0.3                   | 0.4 $\pm$ 0.1                   | 0.2 $\pm$ 0.1                   | 0.6 $\pm$ 0.2                      | 0.2 $\pm$ 0.1                   | 0.2 $\pm$ 0.1                   |
| AMO in buffer ( $\mu$ M)                                | 49.7 $\pm$ 4.7                  | 20.7 $\pm$ 3.4                  | 13.6 $\pm$ 2.3                  | 27.8 $\pm$ 4.1                     | 14.3 $\pm$ 2.5                  | 10.8 $\pm$ 1.3                  |
| Metals per AMO<br>(mol mol <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup> | <b>9.5 <math>\pm</math> 1.0</b> | <b>3.9 <math>\pm</math> 0.7</b> | <b>2.6 <math>\pm</math> 0.4</b> | <b>7.1 <math>\pm</math> 1.0</b>    | <b>3.7 <math>\pm</math> 0.6</b> | <b>2.8 <math>\pm</math> 0.3</b> |

<sup>a</sup> The AMO concentration was 1.63 mg ml<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> The AMO concentration was 1.21 mg ml<sup>-1</sup>.

<sup>c</sup> The metal content was calculated on the basis of a molecular mass of 317 kDa per AMO ( $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ , Gilch et al. 2009a).

## Figure legends

**Fig. 1** X-band EPR spectrum of isolated soluble AMO from *N. europaea*. The protein concentration was 11.7 mg ml<sup>-1</sup> in 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.5). The spectrum was recorded at 10 K with 10 mW of microwave power, modulation amplitude of 10 G, modulation frequency of 100 kHz, and a time constant of 40 ms. The microwave frequency was 9.474 GHz.

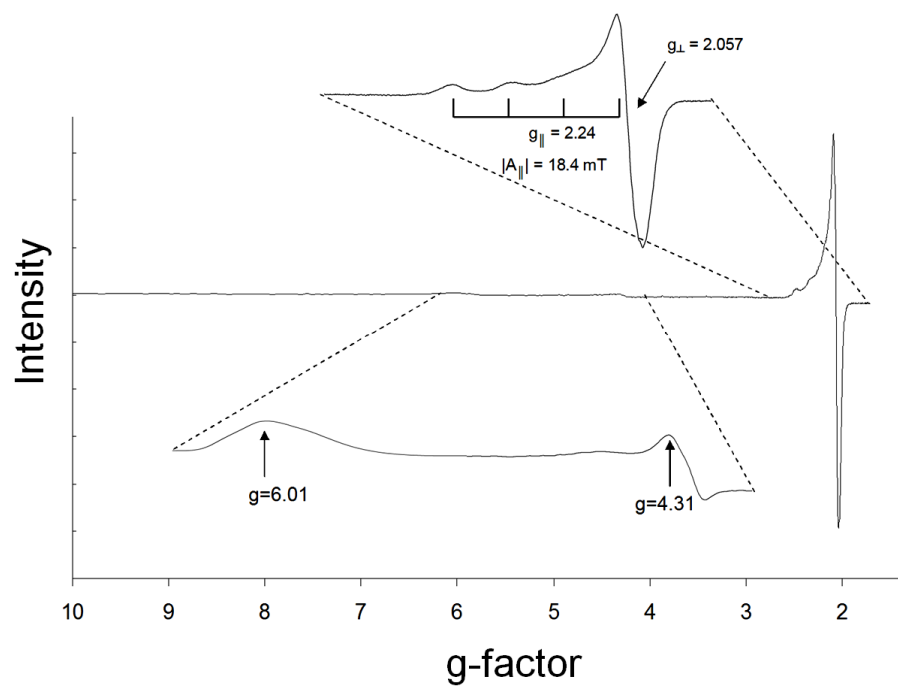
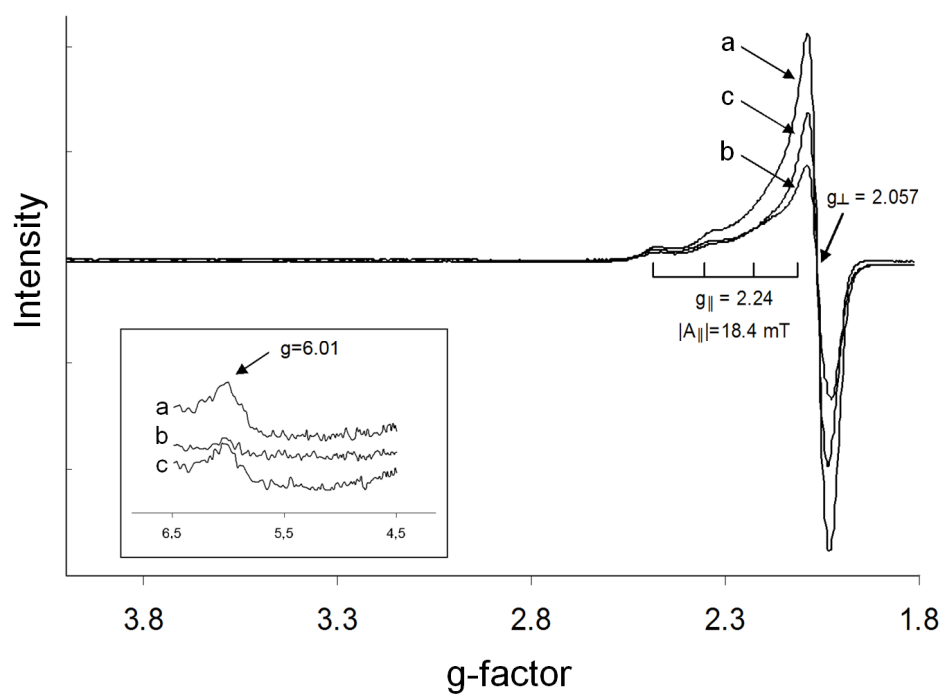
**Fig. 2** X-band EPR spectra of as-isolated soluble AMO (a), soluble AMO after EDTA-treatment (b), and after subsequent addition of 0.5 mM CuCl<sub>2</sub> (c). The inset shows the high spin iron signal at  $g = 6.01$ . Procedures for Cu removal with EDTA and Cu<sup>2+</sup> supplementation with CuCl<sub>2</sub> are described in 'Materials and methods'. All spectra were recorded at 10 K with 10 mW of microwave power, modulation amplitude of 10 G, modulation frequency of 100 kHz, and a time constant of 40 ms. The microwave frequency was 9.474 GHz.

**Fig. 3** X-band EPR spectra of as-isolated soluble AMO (A) and soluble AMO treated with 2 mM ferricyanide (B). Both spectra have been normalized for better comparison. Spectra were recorded at 10 K with 10 mW of microwave power, modulation amplitude of 10 G, modulation frequency of 100 kHz, and a time constant of 40 ms. The microwave frequency was 9.474 GHz.

**Fig. 4** X-band EPR spectra of DT-reduced soluble AMO (A) and DT-reduced soluble AMO treated with nitric oxide NO (B): Both spectra have been normalized for better comparison. Spectra were recorded at 77 K with 2 mW of microwave power, modulation amplitude of 10 G, modulation frequency of 100 kHz, and a time constant of 40 ms. The microwave frequency was 9.474 GHz.

**Fig. 5** X-band EPR-spectra of soluble AMO after reduction by ascorbate and DT. Soluble AMO was partially reduced with 1 mM ascorbate (a), 1 mM DT (b) or fully reduced with 10 mM DT (c). Reduction was performed in the presence of the mediator MPMS (500  $\mu$ M) and under anoxic conditions. Spectra were recorded at 10 K with 10 mW of microwave power, modulation amplitude of 10 G, modulation frequency of 100 kHz, and a time constant of 40 ms. The microwave frequency was 9.474 GHz.

**Fig. 6** X-band EPR spectra of air-oxidized uninhibited soluble AMO (black line) and acetylene inhibited soluble AMO (grey line). Spectra were recorded at 10 K with 10 mW of microwave power, modulation amplitude of 10 G, modulation frequency of 100 kHz, and a time constant of 40 ms. The microwave frequency was 9.474 GHz.

*Figure 1**Figure 2*



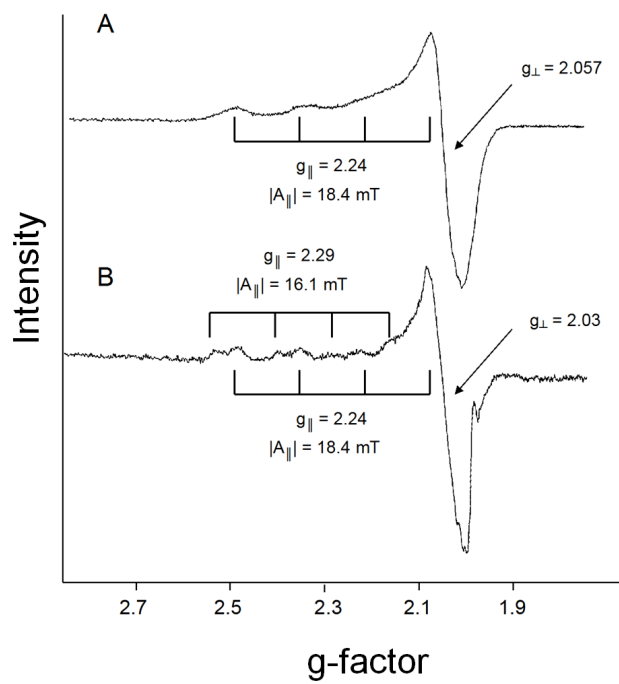


Figure 3

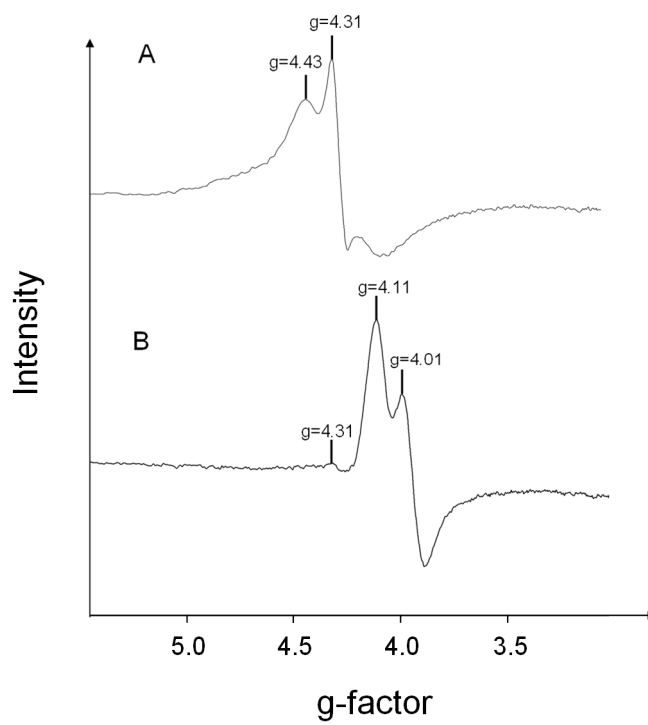
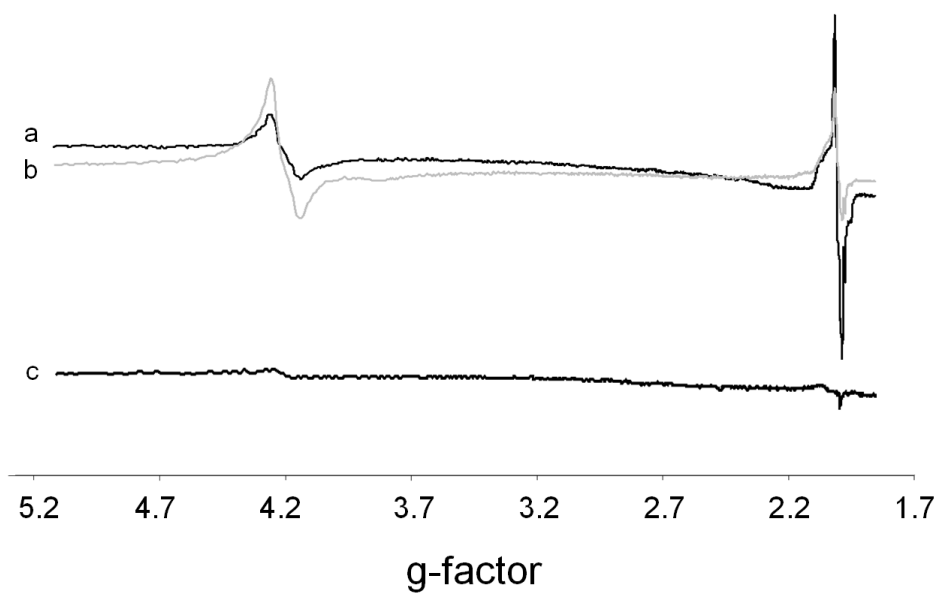
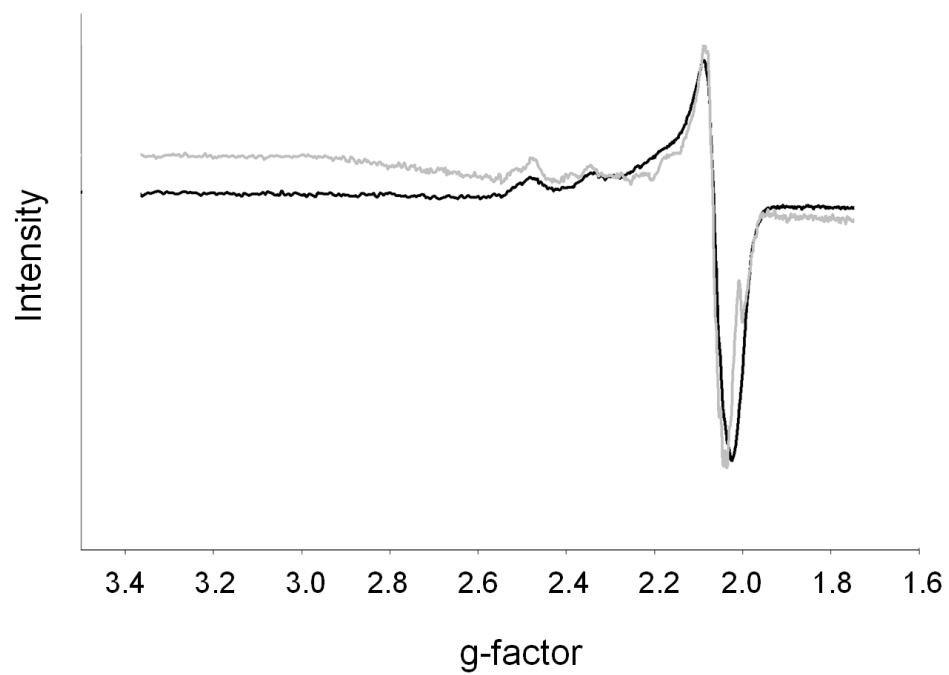


Figure 4

*Figure 5**Figure 6*

## IV

Hydroxylamine disproportion by soluble ammonia monooxygenase from  
*Nitrosomonas europaea*

**Helena Hetzelt, Stefan Gilch, Ortwin Meyer & Ingo Schmidt\***

eingereicht bei *Archives of Microbiology*  
(2009)

Department of Microbiology, University of Bayreuth, 95447 Bayreuth, Germany

\*Corresponding author.

Tel.: +49 921 552714; fax: +49 921 552727;

E-mail: ingo.schmidt1@uni-bayreuth.

### **Darstellung des Eigenanteils:**

Mein Anteil an der Arbeit bestand aus der Fermentation von *N. europaea* sowie der Aufreinigung Acetylen-gehemmter und ungehemmter löslichen AMO. Weiterhin unterstützte ich Helena Hetzelt sowohl bei der Planung als auch bei der Durchführung und Weiterentwicklung des Aktivitätstests in Theorie und Praxis. Der Eigenanteil beläuft sich auf ca. 40 %.

Verfasst wurde diese Publikation von Dr. Ingo Schmidt und mir.

## Abstract

Ammonia monooxygenase (AMO) catalyses the oxidation of ammonia to hydroxylamine, which is the first step in chemolithotrophic nitrogen metabolism and energy conservation of *Nitrosomonas europaea*. This study describes an additional catalytic activity of AMO, a disproportion of hydroxylamine to ammonia, nitrate, and nitrite according to the chemical equation  $3.2 \text{ NH}_2\text{OH} \rightarrow 2 \text{ NH}_3 + 0.8 \text{ HNO}_3 + 0.4 \text{ HNO}_2 + 2.4 \text{ H}^+ + 2.4 \text{ e}^-$ . The reaction catalysed by a soluble form of AMO has a temperature optimum at 45 to 50°C, a pH optimum at 8.5, and is not effected by light or oxygen. Hydroxylamine disproportion is proportional to the amount of AMO and the reaction shows a first-order dependence on the hydroxylamine concentration and a zero-order dependence on the concentration of the electron acceptor iodonitrotetrazolium chloride. The maximum specific activity is about 1,000 nmol  $\text{NH}_2\text{OH}$  (mg AMO)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> and the  $K_m(\text{NH}_2\text{OH})$  value is about 140 μM. Acetylene, a mechanism-based inactivator of ammonia oxidation by AMO, does not inhibit hydroxylamine disproportion, but hydrazine acts as competitive inhibitor of the enzyme. Hydroxylamine disproportion is detectable in intact bacteria at increased hydroxylamine concentration and is suggested to counteract hydroxylamine accumulation during the sequential ammonia oxidation by AMO and hydroxylamine oxidoreductase.

## Key words

Acetylene, ammonia monooxygenase, hydrazine, hydroxylamine disproportion, nitrogen metabolism, *Nitrosomonas europaea*

## Introduction

*N. europaea* is a Gram-negative facultative chemolithoautotrophic bacterium that can obtain energy from aerobic or anaerobic oxidation of ammonia via hydroxylamine to nitrite (Rees and Nason 1966; Hooper et al. 1997; Schmidt and Bock 1997; Schmidt et al. 2004; Beyer et al. 2009). Ammonia oxidation to hydroxylamine is catalysed by ammonia monooxygenase (AMO) and requires oxidant (nitrogen dioxide, oxygen) and reducing equivalents ( $2\text{ H}^+ + 2\text{ e}^-$ ) (Dua et al. 1979; Schmidt and Bock 1997; Arp et al. 2002; Schmidt et al. 2002). Hydroxylamine is subsequently oxidised to nitrite by hydroxylamine oxidoreductase (HAO) (Hooper and Terry 1979; Anderson and Hooper 1983; Wood 1986). Recent studies gave evidence for a soluble conformation of AMO in addition to its membrane-bound conformation (Gilch et al. in press). Like the membrane-bound, the soluble conformation of AMO was shown to be catalytically active *in vivo*, oxidising ammonia and binding the inactivator acetylene ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ). Soluble AMO is a heterotrimeric copper-iron-zinc containing protein consisting of the three subunits AmoA, AmoB, and cytochrome *c*1 ( $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ -subunit structure) with a molecular mass of about 316 kDa (Gilch et al. in press). The current understanding of the biochemistry of ammonia oxidation by AMO relies mainly on studies with intact bacteria and subcellular fractions as well as on homology between AMO and methane monooxygenase (particulate and soluble MMO) (Zahn and DiSpirito 1996; Hooper et al. 1997; Arp et al. 2002; Schmidt and Jetten 2004). Acetylene is an irreversible mechanism-based inactivator of ammonia oxidation in *Nitrosomonas* and was frequently applied to examine AMO catalysis. It was suggested that inactivation of AMO results from an attempted oxidation of acetylene (Hyman and Wood 1985). A ketene is generated and was shown to bind covalently to His-191 of AmoA (Gilch et al. 2009). Acetylene has no effect on hydroxylamine oxidation by HAO at concentrations sufficient to completely inactivate ammonia oxidation (Hynes and Knowles 1978).

Ammonia oxidation activity of AMO was monitored in intact bacteria, crude cell-free extracts, and in soluble and membrane fractions measuring ammonia or oxygen consumption (Suzuki and Kwok 1970; Juliette et al. 1995; Schmidt and Bock 1998). For *N. europaea* activities up to 2,500 nmol  $\text{O}_2$  (mg protein) $^{-1}$  min $^{-1}$  equivalent to about 1,600 nmol  $\text{NH}_3$  (mg protein) $^{-1}$  min $^{-1}$  were reported (Keen and Prosser 1987; Zart and Bock 1998; Chapman et al. 2006; Güven and Schmidt 2009). In cell-free extracts AMO activity is significantly reduced to about 50 nmol  $\text{NH}_3$  (mg protein) $^{-1}$  min $^{-1}$  and activity is completely lost within 8 to 24 h (Suzuki and Kwok 1970; Ensign et al. 1993; Juliette et al. 1995; Schmidt and Bock

1998). Addition of BSA (up to 10 mg ml<sup>-1</sup>), spermine (2 mM), CuCl<sub>2</sub> (up to 0.5 mM), or phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF; 0.5 mM) is appropriate to stabilise *in vitro* activity to some extent (Suzuki and Kwok 1970; Suzuki et al. 1981; Ensign et al. 1993; Juliette et al. 1995). In fresh cell-free extracts in the presence of 10 mg BSA ml<sup>-1</sup> activity was about 82 nmol O<sub>2</sub> (mg protein)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> which was completely lost not until after 96 h when stored at 4°C (Juliette et al. 1995). A comparison of ammonia oxidation activities in bacteria and cell-free extracts is complex. First, *in vivo* the enzyme is embedded in an optimal environment including an electron transport system. *In vitro* the assay conditions might be inappropriate to allow high ammonia oxidation activities, because reductant and electron transfer pathways are not the physiological ones (Suzuki and Kwok 1970). Second, during cell rupture and preparation of subcellular fractions AMO might be damaged, for example by losing metal atoms (Loveless and Painter 1968; Hooper and Terry 1973; Ensign et al. 1993). It was suggested that a loss of Cu (Ensign et al. 1993) and/or destruction of an active site upon exposure to high oxygen concentrations might cause the loss of AMO activity *in vitro*. This loss of activity and the unavailability of purified AMO impeded direct biochemical studies on the enzyme so far. Recently, Gilch et al. (in press) developed a protocol to purify a soluble conformation of AMO from *N. europaea*, which now affords the opportunity of biochemical studies on the purified enzyme.

In the current study we show that the purified soluble form of AMO catalyses a disproportion of hydroxylamine to ammonia, nitrate, and nitrite. Reaction stoichiometry as well as kinetic data of the enzyme were determined. Furthermore, evidence is given that this reaction is also catalysed by the membrane-bound form of AMO. Hydroxylamine disproportion also occurs in intact bacteria of *N. europaea*, suggesting that this AMO activity participates in adjusting hydroxylamine concentration *in vivo* balancing the sequential ammonia oxidation via hydroxylamine to nitrite.

## Materials and Methods

### Organism and growth conditions

Stock cultures of *N. europaea* (ATCC 19718) were grown aerobically in the dark at 28°C in 1-l Erlenmeyer flasks containing 400 ml mineral medium (Schmidt and Bock 1997) shaking at 50 rpm. Cultures in late exponential growth phase were used to inoculate a 30-l fermentor

(Braun, Melsungen, Germany) and biomass was produced in 20 l mineral medium supplemented with 70 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as reported before (Gilch et al. 2009). Bacteria were harvested at a cell number of  $2 \times 10^8 \pm 4 \times 10^7$  cells  $\text{ml}^{-1}$ , concentrated by cross-flow filtration (Hemoflow HF80S, Fresenius medical care), sedimented by low spin centrifugation, and washed twice in mineral medium without ammonium.

#### Purification of soluble AMO

Soluble AMO of *N. europaea* was purified as described before (Gilch et al. in press) by a sequence of French press (8 passages at maximum pressure) ultracentrifugation (160,000  $\times g$  for 4 h at 4°C), anion exchange chromatography (Source 30Q, Amersham Biosciences), cation exchange chromatography (32 Cellulose SERVACEL<sup>®</sup> Serva), ammonium sulphate precipitation (30% [w/v]), hydrophobic interaction chromatography (butyl-Sepharose 4 fast flow, Amersham Biosciences), ammonium sulphate precipitation (40% [w/v]), and gel filtration (Sephadex G-25).

#### Production of acetylene and acetylene inactivated AMO

Acetylene was produced from barium carbide ( $\text{BaC}_2$ ) according to Hyman and Arp (1990) and acetylene was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Gilch et al. in press). To inactivate AMO, *N. europaea* (1 g) suspended in 4 ml mineral medium with 10 mM ammonium was sealed gas-tight in a 25 ml-serum flask. After addition of acetylene (final concentration about 25  $\mu\text{M}$ ), bacteria were incubated shaking with 40 rpm at 28°C (Gilch et al. 2009). Inactivation of AMO was considered complete when nitrite concentration remained constant.

#### Activity assays for AMO

AMO activity with hydroxylamine as substrate was examined in a 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  buffer containing 110  $\mu\text{M}$  iodonitrotetrazolium chloride (INT,  $E_0$  -90 mV), 20  $\mu\text{M}$  methoxyphenazine methosulfate (MPMS), and 0.8% (v/v) Triton X-100 (Kraut et al. 1989). Hydroxylamine and AMO were added to start an assay. The reaction, formation of formazane by the reduction of INT, was monitored in a spectrophotometer at 496 nm and the specific activity was calculated with the molar extinction coefficient for INT of 17.98  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$

(Gremer et al. 2000). Methyleneblue ( $E_0$  +10 mV), NAD ( $E_0$  -320 mV), benzylviologen ( $E_0$  -350 mV), and methylviologen ( $E_0$  -450 mV) were tested as alternative electron acceptors. In AMO-free assays, chemical INT reduction rates dependent on hydroxylamine concentration (0 to 2 mM hydroxylamine), pH value (pH 3.5 to 10.5), and temperature (7 to 70°C) were determined. Results were taken into account calculating specific AMO activities and the reaction stoichiometry of hydroxylamine disproportion.

Oxidation of ammonia by AMO was assayed according to Schmidt and Bock (1998) analysing ammonium, hydroxylamine, and oxygen concentration as well as monitoring the applied electron donor (NADH, or reduced methyleneblue, benzylviologen, methylviologen) in a spectrophotometer.

To measure the oxygen concentration during AMO assays, experiments were performed in a Clark-type Oxygen Electrode Unit (Modell10, Collotec Meßtechnik, Niddatal, Germany). Samples were transferred into a spectrophotometer to quantify the formazane production.

#### Hydroxylamine disproportion by *N. europaea*

Bacteria were harvested from a 30-l fermentor, washed twice in ammonium-free mineral medium (Schmidt and Bock 1997), and the cell number was adjusted to  $10^9$  cell  $\text{ml}^{-1}$ . Aliquots were transferred into reaction vessels stirring at 600 rpm exposed to air at 28 °C. To start experiments ammonium (5 mM) was added and nitrate formation was followed as a direct indicator of hydroxylamine disproportion. Notably, *N. europaea* has no alternative pathways to produce (or consume) nitrate.

#### Miscellaneous analytic procedures

Ammonium was measured according to Schmidt and Bock (1997) (*o*-phtaldialdehyde reagent), nitrite according to Van de Graaf et al. (1996) (*N*-naphthylethylendiamine-dihydrochloride reagent), nitrate according to Velghe and Claeys (1958) (resorcine reagent), and hydroxylamine according to Frear & Burrell (1955) (8-hydroxyquinoline reagent). Protein concentration was determined by the biuret assay (Gornall et al. 1949).



## Results

### AMO activity with hydroxylamine or ammonia as substrate

Previous study gave evidence that soluble form of AMO catalyses ammonia oxidation *in vivo* (Gilch et al. in press). The purified soluble AMO was first assayed with ammonia as substrate (0.1 to 10 mM) and duroquinol, NADH as well as reduced methyleneblue, methylviologen, or benzylviologen as electron donor (0.05 to 1 mM) in the presence of MPMS (20  $\mu$ M) at temperatures between 20 and 50°C and pH values between 6 and 9. Neither ammonia consumption or hydroxylamine production nor an oxidation of the electron donor was detectable.

Hydroxylamine-dependent AMO activity was first examined with 0.5 mM hydroxylamine as substrate and 0.36 mg AMO ml<sup>-1</sup> at pH 7.5 and 35°C. Monitoring INT reduction a specific activity of  $82 \pm 9$  nmol INT (mg AMO)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> was detectable. The total INT reduction was straight proportional to the amount of AMO. As products ammonia, nitrate and nitrite were detectable, giving evidence that hydroxylamine conversion by AMO is not a direct reversion of ammonia oxidation (for stoichiometry of hydroxylamine disproportion see below). In further assays various concentrations of INT (20 to 200  $\mu$ M) and MPMS (0 to 40  $\mu$ M) were applied, but specific AMO activity remained unchanged, except in the absence of MPMS where the activity was reduced to  $5.8 \pm 1.1$  nmol INT (mg AMO)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. As an alternative to INT, methyleneblue ( $39 \pm 8$  nmol methyleneblue [mg AMO<sup>-1</sup>] min<sup>-1</sup>), but not methylviologen, benzylviologen, or NAD could be applied as electron acceptors. Apparently, the redox potential of methylviologen, benzylviologen, and NAD are too low to accept electrons from hydroxylamine disproportion.

The AMO assay was optimised with regard to the physicochemical parameters temperature, pH, oxygen, and light. Highest specific AMO activities were detectable at 45 to 50°C (Fig. 1a) and at a pH of 8.5 (Fig. 1c). The Arrhenius plot in Fig. 1(b) reveals a biphasic character of the enzyme activity with an apparent transition temperature of 35°C. The activation energy for hydroxylamine disproportion by AMO was 94 kJ mol<sup>-1</sup> at temperatures below 35°C and 16 kJ mol<sup>-1</sup> above this temperature. Such a biphasic character might indicate that hydroxylamine disproportion is a process occurring in two or more stages with different temperature optima (Londesborough 1980).

Figure 1

A maximum specific AMO activity at substrate saturation (1.5 mM  $\text{NH}_2\text{OH}$ ), optimal temperature (45 °C), and pH (8.5) was determined with  $315 \pm 27 \text{ nmol INT (mg AMO)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . The specific activity was independent of the oxygen concentration (oxic, anoxic), providing evidence that hydroxylamine consumption by AMO is an oxygen-independent reaction. Ammonia oxidation by *N. europaea* was reported to be inhibited by light (Shears and Wood 1985), but hydroxylamine disproportion by AMO was not influenced by artificial light (70 lx) or sunlight (15,000 lx).

#### Kinetic data of AMO activity

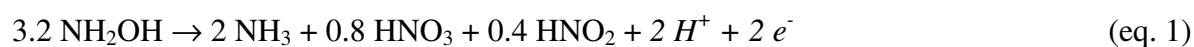
The specific AMO activity is non-proportional dependent on the hydroxylamine concentration (Fig. 2). The  $K_m$  and  $V_{\max}$  values for hydroxylamine disproportion were analysed at pH 8.5 and 45°C (optimal conditions for AMO) and pH 7.5 and 30°C (physiological conditions for *N. europaea*) (Fig. 2). Under optimal conditions a  $K_m$  value of 155  $\mu\text{M}$  and a  $V_{\max}$  of  $323 \text{ nmol INT (mg AMO)}^{-1} \text{ min}^{-1}$  could be calculated. With 142  $\mu\text{M}$  the  $K_m$  was similar under physiological conditions, but the  $V_{\max}$  was significantly lower at  $111 \text{ nmol INT (mg AMO)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

#### Figure 2

#### Stoichiometry of hydroxylamine consumption by AMO

Soluble AMO converts hydroxylamine into ammonia, nitrate, and nitrite and reducing equivalents are transferred on INT. The consumption and production rates are given in Table 1 and the reaction stoichiometry of hydroxylamine disproportion by AMO in equation 1.

Table 1



The reaction is balanced with regard to N- and O-atoms. To balance the redox chemistry 0.4 reducing equivalents ( $0.4 \text{ H}^+ + 0.4 \text{ e}^-$ ) have to be added on the product side. Product

formation in the assay was dependent on the presence of AMO and a chemical disproportion of hydroxylamine can be excluded (verified in sterile control experiments). Furthermore, a chemical disproportion of hydroxylamine would result in the formation of  $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}^+$ , and  $\text{NH}_3$  (Alluisetti et al. 2004).

The membrane fraction (membrane-bound AMO) of *N. europaea* was also assayed and a hydroxylamine disproportion activity of  $754 \pm 119 \text{ nmol NH}_2\text{OH (mg AMO)}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ( $n = 3$ ) was detectable (calculated with membrane-bound AMO representing 11% of membrane protein in *N. europaea*; (Gilch et al. in press). Ammonia, nitrate, and nitrite were also products of hydroxylamine disproportion by membrane-bound AMO, but were detectable in sub-stoichiometric amounts compared to consumed hydroxylamine:  $3.2 \text{ NH}_2\text{OH} \rightarrow 1.7 \text{ NH}_3 + 0.8 \text{ HNO}_3 + 0.2 \text{ HNO}_2 + 2 \text{ H}^+ + 2 \text{ e}^-$ . Possibly other enzymes in the membrane fraction partially consume the products of hydroxylamine disproportion.

For cell-free extracts of *N. europaea*, activities up to  $80 \text{ nmol O}_2 \text{ (mg protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$  were reported (Juliette et al. 1995) equivalent to about  $50 \text{ nmol NH}_3 \text{ (mg protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Because AMO represent about 12% of the total protein in *N. europaea* (Gilch et al. in press), this equals a specific activity of about  $420 \text{ nmol NH}_3 \text{ (mg AMO)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . The maximum specific hydroxylamine disproportion activity of soluble AMO at physiological temperature and pH (Fig. 2a) of about  $320 \text{ nmol NH}_2\text{OH (mg AMO)}^{-1} \text{ min}^{-1}$  is in the same range. Anyhow, under optimal conditions, activity is significantly higher at about  $1,000 \text{ nmol NH}_2\text{OH (mg AMO)}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ( $k_{\text{cat}} 5.3 \text{ sec}^{-1}$ ). The affinity of AMO for the substrate ammonia with a  $K_m$  value of about  $20 \mu\text{M}$  (; Suzuki and Kwok 1974; Schmidt and Bock 1998) is significantly higher than for hydroxylamine with a  $K_m$  value of about  $140 \mu\text{M}$  (Fig. 2).

### Inhibitors of hydroxylamine disproportion

Acetylene, a mechanism-based inactivator of ammonia oxidation by AMO (Hyman and Wood 1985), and phenylhydrazine, a suicide inactivator of the hydroxylamine consumption by HAO (Logan and Hooper 1985), are not inhibitory for hydroxylamine-dependent AMO activity (Table 2). The acetylene concentration in the assay was  $50 \mu\text{M}$ , a concentration that completely inactivates ammonia oxidation by AMO within 5 min (Gilch et al. in press), but an effect on the hydroxylamine-dependent AMO activity was not detectable. Even when acetylene inactivated AMO was assayed (ammonia oxidising bacteria were exposed to acetylene before AMO was purified) activity was not reduced. Phenylhydrazine was shown to

completely inhibit hydroxylamine oxidation at HAO when applied in a 1:1 proportion of phenylhydrazine to HAO (Logan and Hooper 1985). Addition of phenylhydrazine in an about 50-fold excess to AMO did not inhibit hydroxylamine disproportion activity (Table 2). In contrast, hydrazine, a competitive inhibitor of HAO, was inhibitory for hydroxylamine conversion by AMO. In 50-fold excess to the hydroxylamine concentration, the activity of AMO was about 63% reduced (Table 2).

Table 2

Increasing the hydroxylamine concentration from 0.5 to 2 mM the inhibitory effect of hydrazine was reduced (Table 2), confirming a competitive character of inhibition. The affinity of AMO to hydroxylamine is significantly higher than to hydrazine. To achieve a 50% inhibition of hydroxylamine conversion by AMO, an about 30-fold excess of hydrazine was required. Phenylhydrazine and hydrazine were not able support AMO activity as substrates.

#### Hydroxylamine disproportion by *N. europaea*

It was questionable whether hydroxylamine disproportion is an artificial function of AMO *in vitro* or whether it is also a function of the enzyme *in vivo*. To validate hydroxylamine disproportion of *N. europaea*, ammonia oxidising bacteria were supplemented with hydroxylamine. As an alternative, hydrazine or phenylhydrazine was added to bacterial suspension to inhibit HAO and to induce an increased internal hydroxylamine concentration (NH<sub>2</sub>OH formation by AMO). According to equation 1, *N. europaea* should produce ammonia, nitrite, and nitrate from hydroxylamine. Because ammonia and nitrite are already present in *N. europaea* suspensions (substrate and product of ammonia oxidation), nitrate formation was used as indicator for hydroxylamine disproportion (Table 3).

Table 3

According to equation 1, a production of 87  $\mu$ M nitrate (1,000  $\mu$ M NH<sub>2</sub>OH added; Table 3) requires disproportion of about 350  $\mu$ M NH<sub>2</sub>OH. The remaining 650  $\mu$ M were apparently oxidised by HAO to nitrite, since during the experiment about 2.3 mM ammonium were consumed, but about 3 mM nitrite were produced. Inhibition of hydroxylamine oxidation by HAO results in an increased hydroxylamine concentration (Schmidt and Bock 1998), leading

to hydroxylamine disproportion by AMO (Table 3). Hydrazine is a competitive inhibitor of HAO and the enzyme remains active in the presence of hydrazine. At low hydrazine concentrations hydroxylamine produced by AMO was still oxidised to nitrite. With increasing hydrazine concentration inhibition of the HAO was enhanced. As result the hydroxylamine concentration increased and small amounts of nitrate were formed via hydroxylamine disproportion by AMO (Table 3). In contrast, phenylhydrazine ( $> 50 \mu\text{M}$ ; Table 3) inactivates HAO, apparently leading to a rapid accumulation of hydroxylamine via ammonia oxidation. Subsequently, nitrate formation was detectable as a result of hydroxylamine disproportion.

## Discussion

The recent availability of purified soluble AMO from *N. europaea* (Gilch et al. in press) offered first opportunity for a direct biochemical characterisation of the enzyme. As reported before, soluble AMO, like membrane-bound AMO, loses its ammonia oxidation activity rapidly *in vitro* (Suzuki and Kwok 1970; Ensign et al. 1993; Juliette et al. 1995; Schmidt and Bock 1998; Gilch et al. in press) and the purified enzyme was incapable of ammonia oxidation. Instead, the enzyme was found to be catalytically active with hydroxylamine as substrate not catalysing a directly reversed ammonia oxidation (hydroxylamine reduction to ammonia and oxygen), but a disproportion of hydroxylamine into ammonia, nitrate, and nitrite (Table 1, eq. 1). This activity was also detectable in intact bacteria indicated by nitrate production in response to increased hydroxylamine concentrations (Table 3).

A liberation of Cu during AMO purification (Gilch et al. in press) was suggested to cause the loss of ammonia oxidation activity (Ensign et al. 1993), but does not inactivate hydroxylamine disproportion by the enzyme (Fig. 1, 2, Table 1). In contrast to ammonia oxidation, oxygen or nitrogen oxides are not involved in hydroxylamine disproportion (Table 1). Therefore, the loss of Cu might cause an inability of purified AMO to co-ordinate the oxidant(s)  $\text{O}_2$  and/or  $\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$  (Schmidt et al. 2001) impeding ammonia oxidation. This assumption is supported by inhibitor studies. Acetylene has no significant effect on the hydroxylamine-dependent AMO activity (Table 2). The ineffectiveness of acetylene shows that acetylene/ketene (activated acetylene binds as ketene at His-191 of AmoA [Gilch et al. 2009]) interacts with a catalytic site required for ammonia oxidation, but not for hydroxylamine disproportion. Hence, it must be assumed that acetylene/ketene interferes with a site involved in co-ordination of the oxidant(s).

The biphasic character of hydroxylamine disproportion (Fig. 1b) indicates that the reaction involves at least two stages. Based on the reaction stoichiometry (eq. 1) and the two step reaction mechanism of catalase (Chelikani et al. 2004), we propose a two to three step mechanism for the disproportion of hydroxylamine by AMO (Fig. 3). In a first step, AMO reduces one hydroxylamine molecule forming ammonia (1). AMO is a Cu- and Fe-containing enzyme (Gilch et al. in press) and both metals are candidates for binding an oxygen atom. In a second step (2 or 4), either a second hydroxylamine molecule is utilised as reductant to regenerate the initial state of AMO liberating nitrite (4), or AMO reduces hydroxylamine again forming a second ammonia molecule (2). In a third step, hydroxylamine is then oxidised to nitrate, transferring AMO into its initial state again (3). Reaction 1 to 3 (three step mechanism) would result in the conversion of three hydroxylamine into two ammonia and one nitrate, whereas reactions 1 and 4 (two step mechanism) would produce one ammonia and one nitrite from two hydroxylamine. In both cases, reducing equivalents are produced allowing reduction of INT to formazane (Table 1, Fig. 3). A combination of the two and three step mechanism can result in a conversion of hydroxylamine into ammonia, nitrate, and nitrite. The reaction stoichiometry according to equation 1 was fixed in the experiments performed, but it can not be excluded yet that modification of the enzyme assay might influence the proportion of pathways 1 to 3 and 1 and 4, leading to a different reaction stoichiometry.

### Figure 3

Evidence that hydroxylamine disproportion (eq. 1) occurs in *N. europaea* is provided by the observation that intact bacteria convert hydroxylamine partially into nitrate (Table 3). Hydroxylamine disproportion is able to provide reducing equivalents (2.4[H] per 3.2 NH<sub>2</sub>OH; Table 1, eq. 1), but in contrast to ammonia oxidation (net 2[H] per NH<sub>3</sub>), the efficiency is low and a significant growth of *N. europaea* on hydroxylamine has not been observed so far (Boettcher and Koops 1994; de Bruijn et al. 1995). Hydroxylamine is an intermediate of the sequential oxidation of ammonia by AMO and HAO, and unbalanced enzyme activities, for example caused by the physical separation of the enzymes (AMO cytoplasmic [Gilch et al. in press], HAO periplasmic [Olson and Hooper 1983]), may result in an overproduction and accumulation of hydroxylamine (Zart 1997). Hydroxylamine disproportion would be a suitable mechanism to counteract such an accumulation of hydroxylamine and thus to protect *N. europaea* from the toxic effect of high hydroxylamine concentrations. Hydroxylamine

disproportion allows a removal of hydroxylamine (detoxification) and even regenerates the substrate ammonia, which might explain the slow growth observed on hydroxylamine (Boettcher and Koops 1994; de Bruijn et al. 1995). In this perspective, hydroxylamine disproportion might contribute to a regulation of inorganic N-metabolism and energy conservation in *N. europaea*. This assumption is supported by the finding that the  $K_m$  value of AMO for hydroxylamine (140 to 160  $\mu\text{M}$ ; Fig. 2) corresponds to the concentration of hydroxylamine that acts inhibitory on *N. europaea* (100 to 150  $\mu\text{M}$ ; Zart 1997).

### Acknowledgment

This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). The expert technical assistance of Matthias Schlotter is gratefully acknowledged.

### References

- Alluisetti GE, Almaraz AE, Amorebieta VT, Doctorovich F., Olabe JA (2004) Metal-catalyzed anaerobic disproportionation of hydroxylamine. Role of diazene and nitroxyl intermediates in the formation of  $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}^+$ , and  $\text{NH}_3$ . *J Am Chem Soc* 126:13432-13442
- Anderson KK, Hooper AB (1983)  $\text{O}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$  are each the source of one O in  $\text{NO}_2^-$  produced from  $\text{NH}_3$  by *Nitrosomonas*;  $^{15}\text{N}$ -NMR evidence. *FEBS Lett* 164:236-240
- Arp DJ, Sayavedra-Soto LA, Hommes NG (2002) Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch Microbiol* 178:250-255
- Beyer S, Gilch S, Meyer O, Schmidt I (2009) Transcription of genes coding for metabolic key functions in *Nitrosomonas europaea* during aerobic and anaerobic growth. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16:187-197
- Boettcher B, Koops H-P (1994) Growth of lithotrophic ammonium-oxidizing bacteria on hydroxylamine. *FEMS Microbiol Lett* 122:253-266
- Chapman BD, Schleicher M, Beuger A, Gostomski P, Thiele JH (2006) Improved methods for the cultivation of the chemolithoautotrophic bacterium *Nitrosomonas eutropha*. *J Microbiol Meth* 65:96-106
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 61:192-208

- de Bruijn P, van de Graaf AA, Jetten MSM, Robertson LA, Kuenen JG (1995) Growth of *Nitrosomonas europaea* on hydroxylamine. FEMS Microbiol Lett 125:179-184
- Dua RD, Bhandari B, Nicholas DJD (1979) Stable isotope studies on the oxidation of ammonia to hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*. FEBS Lett 106:401-404
- Ensign SA, Hyman MR, Arp DJ (1993) *In vitro* activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. J Bacteriol 175:1971-1980
- Frear DS, Burrell RC (1955) Spectrophotometric method for determining hydroxylamine reductase activity in higher plants. Anal Chem 27:1664-1664
- Gilch S, Meyer O, Schmidt I (in press) A soluble form of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. Biol Chem Doi: 10.1515/BC.2009.085
- Gilch S, Vogel M, Lorenz MW, Meyer O, Schmidt I (2009) Interaction of the mechanism-based inactivator acetylene with ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. Microbiology 155:279-284
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol Chem 177:751-766
- Gremer L, Kellner S, Dobbek H, Huber R, Meyer O (2000) Binding of flavin adenine dinucleotide to molybdenum-containing carbon monoxide dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*. Structural and functional analysis of a carbon monoxide dehydrogenase species in which the native flavoprotein has been replaced by its recombinant counterpart produced in *Escherichia coli*. J Biol Chem 275:1864-1872
- Güven D, Schmidt I (2009) Specific activity and viability of *Nitrosomonas europaea* during discontinuous and continuous fermentation. Process Biochemistry 44:516-520
- Hooper AB, Terry KR (1973) Specific inhibitor of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. J Bacteriol 115:480-485
- Hooper AB, Terry KR (1979) Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas* - production of NO from hydroxylamine. Biochim Biophys Acta 571:12-20
- Hooper AB, Vannelli T, Bergmann DJ, Arciero DM (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 71:59-67
- Hyman MR, Arp DJ (1990) The small-scale production of [U-<sup>14</sup>C]acetylene from Ba<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>: application to labeling of ammonia monooxygenase in autotrophic nitrifying bacteria. Anal Biochem 190:348-353
- Hyman MR, Wood PM (1985) Suicidal inactivation and labelling of ammonia monooxygenase by acetylene. Biochem J 227:719-725



- Hynes RK, Knowles R (1978) Inhibition by acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. FEMS Microbiol Lett 4:319-321
- Juliette LJ, Hyman MR, Arp DJ (1995) Roles of bovine serum albumin and copper in the assay and stability of ammonia monooxygenase activity *in vitro*. J Bacteriol 177:4908-4913
- Keen GA, Prosser JI (1987) Steady state and transient growth of autotrophic nitrifying bacteria. Arch Microbiol 147:73-79
- Kraut M, Hugendieck I, Herwig S, Meyer O (1989) Homology and distribution of CO dehydrogenase structural genes in carboxydophilic bacteria. Arch Microbiol 149:540-546
- Logan MSP, Hooper AB (1995) Suicide inactivation of hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas europaea* by organohydrazines. Biochem 34:9257-9264
- Londesborough J (1980) The cause of sharply bent or discontinuous Arrhenius plots for enzyme-catalysed reactions. Eur J Biochem 105:211-215
- Loveless JE, Painter HA (1968) The influence of metal ion concentrations and pH value on the growth of a *Nitrosomonas* strain isolated from activated sludge. J Gen Microbiol 52:1-14
- Olson TC, Hooper AB (1983) Energy coupling in the bacterial oxidation of small molecules: an extracytoplasmic dehydrogenase in *Nitrosomonas*. FEMS Microbiol Lett 19:47-50
- Rees M, Nason A (1966) Incorporation of atmospheric oxygen into nitrite formed during ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. Biochem Biophys Acta 113:398-401
- Schmidt I, Bock E (1997) Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. Arch Microbiol 167:106-111
- Schmidt I, Bock E (1998) Anaerobic ammonia oxidation by cell-free extracts of *Nitrosomonas eutropha*. Antonie van Leeuwenhoek 73:271-278
- Schmidt I, Bock E, Jetten MSM (2001) Ammonia oxidation by *Nitrosomonas eutropha* with NO<sub>2</sub> as oxidant is not inhibited by acetylene. Microbiology 147:2247-2253
- Schmidt I, Jetten MSM (2004) Anaerobic oxidation of inorganic nitrogen compounds. In: Nakano MM, Zuber P (eds) Strict and facultative anaerobes: medical and environmental aspects. Horizon Scientific Press. Springer-Verlag, pp 283-303
- Schmidt I, Sliekers O, Schmid M, Cirpus I, Strous M, Bock E, Kuenen JG, Jetten MSM (2002) Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria – competitors or natural partners? FEMS Microbiology Ecology 39:175-181

- Schmidt I, van Spanning RJM, Jetten MSM (2004) Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and NirK and NorB-deficient mutants. *Microbiology* 150:4107-4114
- Shears JH, Wood PM (1985) Spectroscopic evidence for a photosensitive oxygenated state of ammonia monooxygenase. *Biochem J* 226:499-507
- Suzuki I, Kwok SC (1970) Cell-free ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* extracts: Effects of polyamines,  $Mg^{2+}$  and albumin. *Biochem Biophys Res Commun* 39:950-955
- Suzuki I, Kwok SC (1974) Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J Bacteriol* 120:556-558
- Suzuki I, Kwok SC, Dular U, Tsang DCY (1981) Cell-free ammonia oxidizing system of *Nitrosomonas europaea*: general conditions and properties. *Can J Biochem* 59:477-483
- van de Graaf AA, de Bruijn P, Robertson LA, Kuenen JG (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 142:2187-2196
- Velghe N, Claeys A (1958) Rapid spectrophotometric determination of nitrate in mineral waters with resorcinol. *Analyst* 110:313-314
- Wood PM (1986) Nitrification as a bacterial energy source. In: Prosser JI (ed) *Nitrification*. Soc. Gen. Microbiol. IRL Press, Washington, D.C, pp 39-62
- Zahn JA, DiSpirito AA (1996) Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J Bacteriol* 178:1018-1029
- Zart D (1997) Entwicklung eines Verfahrens zur Entfernung von Ammonium-Stickstoff mit Hilfe einer Reinkultur von *Nitrosomonas europaea* (Development of a process for ammonia nitrogen elimination with a pure culture of *Nitrosomonas europaea*). Dissertation, University of Hamburg.
- Zart D, Bock E (1998) High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous  $NO_2$  or NO. *Arch Microbiol* 169:282-286

**Table 1** Hydroxylamine disproportion by AMO - substrate consumption and product formation activities. The concentrations of hydroxylamine, ammonium, nitrate, nitrite, and formazane (reduced INT) were determined and the consumption (hydroxylamine) and production rates (ammonia, nitrate, nitrite, formazane) were calculated. Assays were performed at 45°C and pH 8.5 with 0.36 mg AMO ml<sup>-1</sup> and 1.5 mM hydroxylamine (substrate saturation; Fig. 2a). During the assay (5 min) samples were taken in 1 min time intervals. Results are mean values of 14 replicated assays (±S.D.).

|                            | NH <sub>2</sub> OH <sup>a</sup>                  | NH <sub>3</sub> <sup>b</sup> | HNO <sub>3</sub> <sup>b</sup> | HNO <sub>2</sub> <sup>b</sup> | Formazane <sup>b</sup> |
|----------------------------|--|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|
|                            | (nmol [mg AMO] <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) |                              |                               |                               |                        |
| Activity                   | 997.8 ± 48                                       | 619.4 ± 40                   | 260.4 ± 12                    | 123.9 ± 5                     | 315.0 ± 7              |
| Stoichiometry <sup>c</sup> | 3.2  | 2.0                          | 0.8                           | 0.4                           | 1                      |

<sup>a</sup> Compound consumed

<sup>b</sup> Compound produced

<sup>c</sup> formazane production was set at 1

**Table 2** Specific AMO activity in the presence of acetylene, phenylhydrazine, and hydrazine as well as activity of acetylene-binding AMO. Assays were performed with 0.5 mM hydroxylamine and 0.36 mg AMO ml<sup>-1</sup> (AMO: 316 kA; Gilch et al. in press), hence, about 1.1 µM AMO) at pH 8.5 and 45°C for 10 to 20 min. Chemical reduction of INT by hydrazine or phenylhydrazine was taken into account. Specific activities are mean values of eight assays (±S.D.).

| Assay                                  | Specific activity<br>(nmol INT [mg AMO] <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) |          |          |
|--|---|----------|----------|
| Acetylene (50 µM) <sup>a</sup>         | 247 ± 16  |          |          |
| Acetylene inhibited AMO <sup>b</sup>   | 261 ± 22  |          |          |
| Phenylhydrazine (1, 10, or 50 µM)      | 242 ± 12  | 225 ± 24 | 238 ± 21 |
| Hydrazine (0.5, 5, 25 mM)              | 218 ± 21  | 166 ± 17 | 80 ± 19  |
| Hydrazine (0.5, 5, 25 mM) <sup>c</sup> | 321 ± 14  | 276 ± 23 | 219 ± 16 |

<sup>a</sup> Acetylene was added to the assay at a concentration of 50 µM, which is sufficient to completely inhibit AMO-dependent ammonia oxidation in *N. europaea* within 5 min (Gilch et al. in press)

<sup>b</sup> AMO was inactivated with acetylene in intact bacteria, purified, and then applied in the assays

<sup>c</sup> Assays were performed with 2 mM hydroxylamine (substrate saturation)

**Table 3** Nitrate formation via hydroxylamine disproportion by *N. europaea*. Experiments were performed in mineral medium containing 5 mM NH<sub>4</sub>Cl with 10<sup>9</sup> bacteria ml<sup>-1</sup>. After hydroxylamine, hydrazine, or phenylhydrazine were added, nitrate formation was followed for 25 min. The given values represent nitrate concentrations after 25 min. Except hydroxylamine disproportion, other pathways for nitrate formation in *N. europaea* are not known. As control, all experiments were performed without bacteria or with heat inactivated *N. europaea*, and nitrate formation was not detectable. At hydrazine concentrations up to 25 mM hydroxylamine disproportion by AMO is not inhibited completely (Table 2), still allowing nitrate formation. Results are mean values of three replicated experiments (±S.D.).

| Added compound           | Nitrate<br>(μM) | Added compound           | Nitrate<br>(μM) |
|--------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
| Hydroxylamine (0 μM)     | n.d.            | Hydrazine (1 mM)         | n.d.            |
| Hydroxylamine (50 μM)    | n.d.            | Hydrazine (5 mM)         | n.d.            |
| Hydroxylamine (100 μM)   | n.d.            | Hydrazine (10 mM)        | 7±4             |
| Hydroxylamine (200 μM)   | 10±3            | Hydrazine (25 mM)        | 17±3            |
| Hydroxylamine (500 μM)   | 27±3            |                          |                 |
| Hydroxylamine (1,000 μM) | 87±7            | Phenylhydrazine (1 μM)   | n.d.            |
|                          |                 | Phenylhydrazine (10 μM)  | 15±6            |
|                          |                 | Phenylhydrazine (50 μM)  | 145±25          |
|                          |                 | Phenylhydrazine (500 μM) | 139±21          |

n.d. not detectable

**Fig. 1** Temperature and pH dependency of specific AMO activity. (a) Effect of the temperature at pH 7.5 and (b) activation energy and transition temperature of hydroxylamine disproportion by AMO (Arrhenius plot was calculated from data in (a)); (c) Effect of the pH on AMO activity at 35°C. Assays contained 0.36 mg AMO ml<sup>-1</sup> and 0.5 mM hydroxylamine. Specific activities are mean values of six assays. V: Activity in nmol INT (mg AMO)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, T: temperature (K), E: activation energy, R: gas constant.

**Fig. 2** Specific AMO activity (INT reduction) as a function of hydroxylamine concentration. (a) Michaelis-Menten plot; (b) Hanes Plot. Assays were performed with 0.36 mg AMO ml<sup>-1</sup> at pH 8.5 and 45°C (■) or pH 7.5 and 30°C (□). Specific activities are mean values of five assays (■: S.D. 8 %; □ S.D. 11 %). V: Activity in nmol INT (mg AMO)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>; [NH<sub>2</sub>OH]: hydroxylamine concentration (μM).

**Fig. 3** Proposed reaction mechanism for the disproportion of hydroxylamine by AMO. (1 to 4): Reactions catalysed. Reactions (1 to 3): Three step mechanism, Reactions (1 and 4): Two step mechanism. Reducing equivalents [H] are transferred to INT. A two to three step mechanism is supported by the biphasic character of hydroxylamine disproportion with regard to activation energy (Fig. 1b) indicating the reaction occurs in two or more stages with different temperature optima.

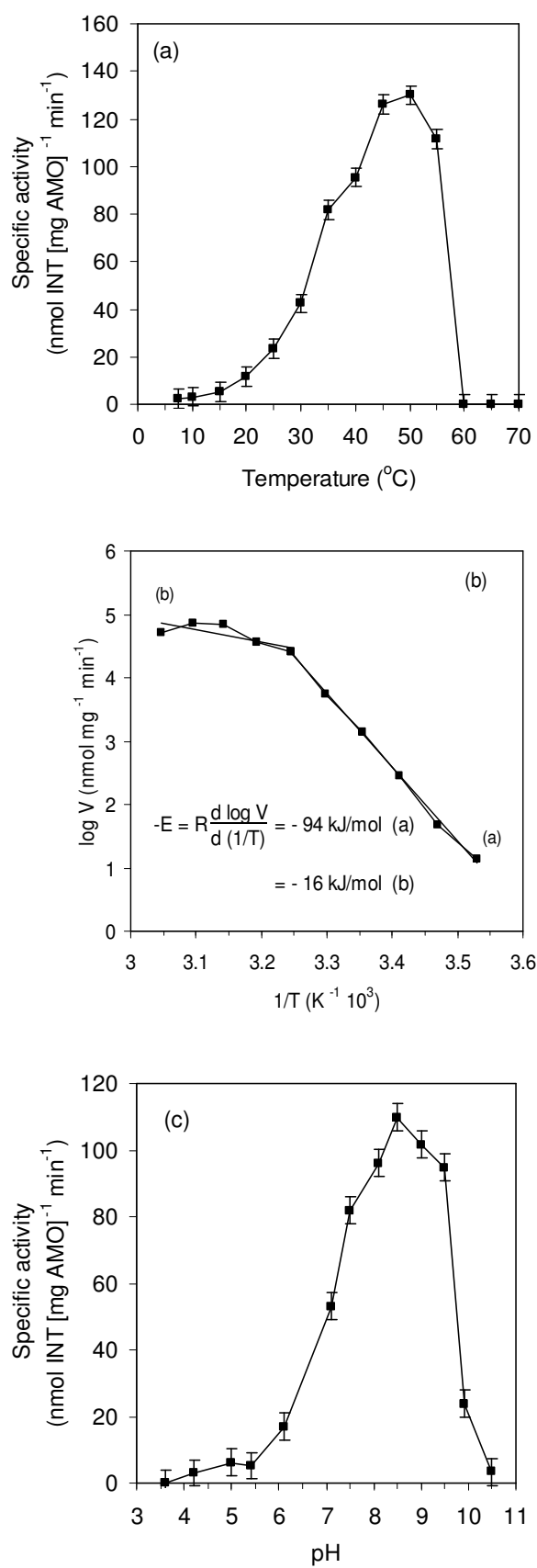
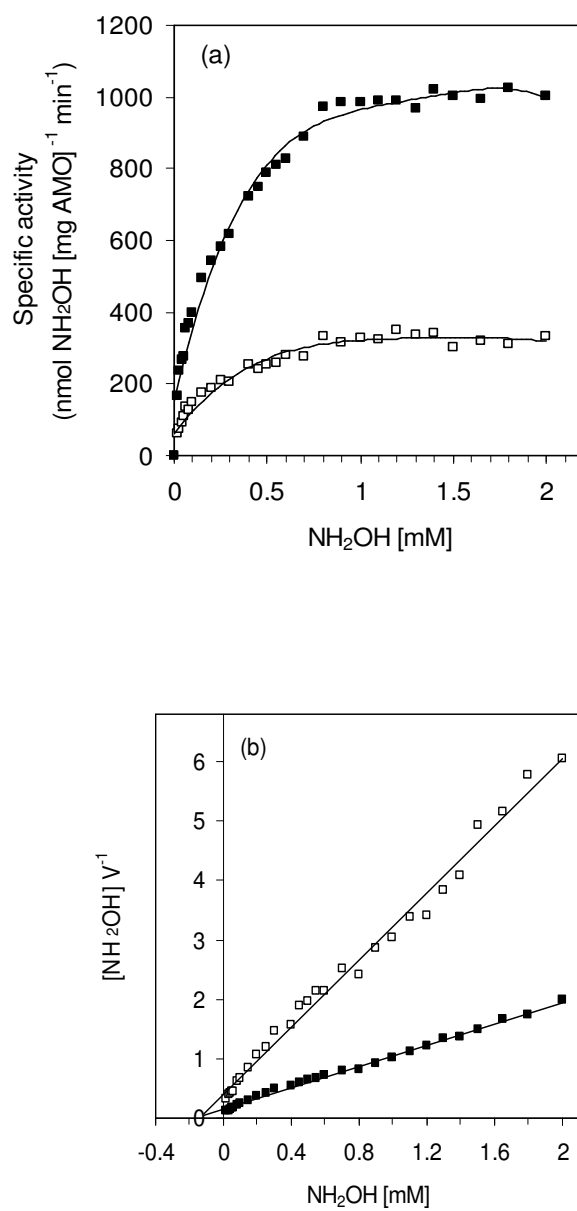
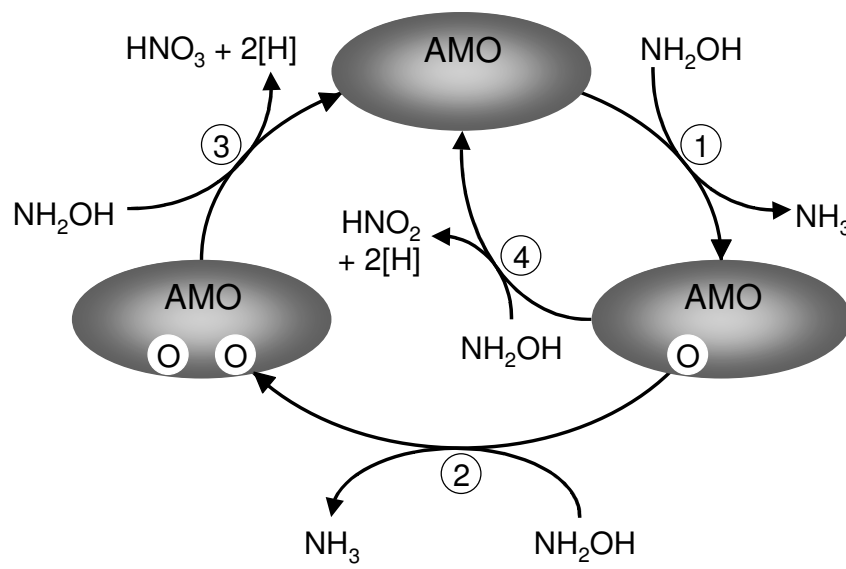


Figure 1

*Figure 2*

*Figure 3*



## V

Functional and physiological evidence for a Rhesus-type ammonia  
transporter in *Nitrosomonas europaea*

**Kerstin Weidinger<sup>†</sup>, Benjamin Neuhäuser<sup>‡</sup>, Stefan Gilch<sup>†</sup>, Uwe Ludewig<sup>‡</sup>,  
Ortwin Meyer<sup>†</sup> & Ingo Schmidt<sup>†,\*</sup>**

*FEMS Microbiology Letters* **273**, 260-267  
(2007)

<sup>†</sup> Department of Microbiology, University of Bayreuth, 95447 Bayreuth, Germany

<sup>‡</sup> Department of Plant Physiology, University of Tübingen, 72074 Tübingen, Germany

\*Corresponding author.

Tel.: +49 921 552714; fax: +49 921 552727;

E-mail: ingo.schmidt1@uni-bayreuth.de

**Darstellung des Eigenanteils:**

Mein Anteil an dieser Arbeit erstreckte sich von der Fermentation von *N. europaea* über deren Hemmung mit Acetylen bis hin zur Messung der Transportaktivitäten mittels [<sup>14</sup>C]-Methylammonium. Weiterhin trug ich durch konstruktive Diskussionen und Ideenbildung zu dieser Arbeit bei. Die Expression des Ammoniaktransporters Rh1 in *S. cerevisiae* wurde am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen unter Leitung von Dr. Uwe Ludewig und Benjamin Neuhäuser durchgeführt. Der Eigenanteil beläuft sich auf ca. 30 %. Verfasst wurde diese Publikation von Dr. Ingo Schmidt.



## Functional and physiological evidence for a Rhesus-type ammonia transporter in *Nitrosomonas europaea*

Kerstin Weidinger<sup>1</sup>, Benjamin Neuhäuser<sup>2</sup>, Stefan Gilch<sup>1</sup>, Uwe Ludewig<sup>2</sup>, Ortwin Meyer<sup>1</sup> & Ingo Schmidt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Bayreuth, Bayreuth, Germany; and <sup>2</sup>Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Pflanzenphysiologie, Universität Tübingen, Tübingen, Germany

**Correspondence:** Ingo Schmidt, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Bayreuth, 95447 Bayreuth, Germany. Tel.: +49 921 552714; fax: +49 921 552727; e-mail: ingo.schmidt1@uni-bayreuth.de

Received 30 January 2007; revised 25 April 2007; accepted 9 May 2007.  
First published online 30 June 2007.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.00805.x

Editor: Sergio Casella

### Keywords

*Nitrosomonas europaea*; ammonium transport; Rh-type transporter; Rh1; methylammonium; nitrogen metabolism.

### Abstract

Ammonium transporters form a conserved family of transport proteins and are widely distributed among all domains of life. The genome of *Nitrosomonas europaea* codes for a single gene (*rh1*) that belongs to the family of the AMT/Rh ammonium transporters. For the first time, this study provides functional and physiological evidence for a Rhesus-type ammonia transporter in bacteria (*N. europaea*). The methylammonium (MA) transport activity of *N. europaea* correlated with the Rh1 expression. The  $K_m$  value for the MA uptake of *N. europaea* was  $1.8 \pm 0.2$  mM (pH 7.25), and the uptake was competitively inhibited by ammonium [ $K_i(\text{NH}_4^+)$   $0.3 \pm 0.1$  mM at pH 7.25]. The MA uptake rate was pH dependent, indicating that the uncharged form of MA is transported by Rh1. An effect of the glutamine synthetase on the MA uptake was not observed. When expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, the function of Rh1 from *N. europaea* as an ammonia/MA transporter was confirmed. The results suggest that Rh1 equilibrates the uncharged substrate species. A low pH value in the periplasmic space during ammonia oxidation seems to be responsible for the ammonium accumulation functioning as an acid  $\text{NH}_4^+$  trap.

### Introduction

Ammonia-oxidizing bacteria are a versatile group of micro-organisms found in many ecosystems. Under oxic or anoxic conditions, *Nitrosomonas europaea* is able to gain energy via ammonia oxidation with oxygen or nitrogen dioxide (Dua *et al.*, 1979; Anderson & Hooper, 1983; Hyman & Wood, 1985; Schmidt & Bock, 1997). As an alternative, ammonia oxidizers grow under anoxic conditions via denitrification. Pyruvate, acetate, or hydrogen are used as substrates (Bock *et al.*, 1995; Schmidt & Jetten, 2004; Schmidt *et al.*, 2004b). Denitrifying cells are not able to use ammonium as their energy source, but use ammonium as a nitrogen source (Bock *et al.*, 1995).

The current assumption that free ammonia ( $\text{NH}_3$ ) rather than ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) is the substrate for the ammonia oxidation in *Nitrosomonas* is based on the observation that the  $K_m$  value of the AMO is pH dependent when determined for the substrate ammonium, but the effect of the pH value virtually disappears when ammonia is assumed to be the substrate (Suzuki *et al.*, 1974; Schmidt & Bock, 1998). Throughout this paper, the term 'ammonium' is used for

the sum of  $\text{NH}_3$  and  $\text{NH}_4^+$ , and 'ammonia' is used for  $\text{NH}_3$ . It was suggested that  $\text{NH}_3$  is transported via passive diffusion through the cell membrane (Kleiner, 1981). On the other hand, the occurrence of highly active ammonia oxidizers at low pH values (Tarre & Green, 2004) and the high ammonium uptake rates of *N. europaea* (Schmidt *et al.*, 2004a) suggest that the ammonium transport might be facilitated by a transport protein.

AmtB-type ammonium transporters are widely spread in archaea, fungi, plants, and invertebrate animals and are the usual transporters in eubacteria (Huang & Peng, 2005). Rh-type transporters belong to the same superfamily, but are extremely rare in bacteria (Chain *et al.*, 2003; Huang & Peng, 2005). In contrast to AmtB-type proteins with eleven transmembrane helices, Rh proteins have been predicted to possess 12 transmembrane domains (Winkler, 2006). In the structure of AmtB and Rh-type proteins, a pore is formed lined by hydrophobic side chains that is supposed to channel ammonium. Trp148 and Ser219, which are important for ammonium binding in AmtB proteins, are replaced by aliphatic residues in Rh proteins. As a consequence, Rh-type transporters show saturation with apparent  $K_m$  values in the

millimolar range (RhAG:  $K_m = 1.6$  mM). An effective inhibition of the MA uptake by ammonium at millimolar concentrations was observed (Marini *et al.*, 2000; Ludewig, 2004). The type of physiological substrate ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$ , or  $\text{CO}_2$ ) of Rh-type transporters is still under debate, but recent data suggest that net transport is as a channel-like  $\text{NH}_3$  transport or  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$  exchange (Marini *et al.*, 2000; Westhoff *et al.*, 2002; Ludewig, 2004; Mak *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 2006). Rh-type transporters seem to support a bi-directional ammonium transport and equilibrate ammonia across the membrane (Marini *et al.*, 2000). A gene coding for GlnK, a  $\text{P}_{11}$  signal transduction protein that regulates the activity of ammonium transporters in many bacteria in response to the nitrogen status, does not exist in *N. europaea* (Arcondeguy *et al.*, 2001; Chain *et al.*, 2003; Huang & Peng, 2005).

This study aimed at investigating the ammonium uptake of *N. europaea*, with special focus on the involvement of the rhesus-type Rh1 protein. The biochemical characterization of the ammonium transport gave evidence for ammonia being the transported substrate and for a bi-directional ammonia transport mechanism of Rh1.

## Materials and methods

### Organisms and growth conditions

*Nitrosomonas europaea* was grown in 30 L laboratory-scale reactors operated as Chemostat (Braun, Melsungen, Germany) with 20 L mineral medium (Schmidt & Bock, 1997). To produce 'nitrifying *N. europaea* cells', the reactor was aerated with  $0.2\text{--}8\text{ L air min}^{-1}$ . The temperature was maintained at  $28^\circ\text{C}$  and the dissolved oxygen at  $5 \pm 0.2\text{ mg L}^{-1}$ . The pH value was maintained at 7.4 [20% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ]. Ammonium, nitrite, and nitrate concentrations were documented. The dilution rate of the Chemostat varied between 0.002 (start-up) and about  $0.1\text{ h}^{-1}$  (biomass production). The ammonium concentration was adjusted at  $1 \pm 0.5\text{ mM}$ , and the cell number was  $2 \times 10^8 \pm 3 \times 10^7\text{ cells mL}^{-1}$ .

'Denitrifying *N. europaea* cells' were grown in the same reactor system under anoxic conditions. Medium and gas atmosphere were composed as described earlier (Bock *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 2004b), but the medium (denitrification medium) contained 5 mM sodium nitrite, 5 mM sodium pyruvate, and 0.25 mM ammonium chloride. The redox potential of the medium was adjusted between  $-300$  and  $-200\text{ mV}$  using sodium sulfide ( $\text{Na}_2\text{S}$ ). The preparation of cell-free extracts of *N. europaea* and the determination of the ammonia oxidation activity in these have been described before (Schmidt & Bock, 1998). The ammonium transporter-deficient strain of *Saccharomyces cerevisiae* (31019b;  $\Delta\Delta\Delta\text{mep1;2;3}$ ) and the corresponding wild-type strain (23344c) (Marini *et al.*, 1997) were grown in a YNB

medium (pH 5.5) according to Mayer *et al.* (2006). *Nitrosomonas europaea* Rh1 (gi\_30248465) as well as AtAMT1;1 were subcloned into pDR199 and were expressed in a wild type and in an ammonium transporter-deficient strain of *S. cerevisiae*. The expression and functionality of the protein were documented as described previously (Mayer *et al.*, 2006).

### [ $^{14}\text{C}$ ]MA transport assay

*Nitrosomonas europaea* cells (Chemostat) were washed twice in mineral medium without ammonium (pH value as required for the following experiment). The cell number was adjusted at about  $5 \times 10^9\text{ cells mL}^{-1}$ . The bacteria suspensions ( $28^\circ\text{C}$ ) were stirred (800 r.p.m.), and the experiments were started with the addition of methylammonium (MA) or ammonium. [ $^{14}\text{C}$ ]MA (Biotrend, Köln, Germany;  $55\text{ mCi mmol}^{-1}$ ) was used as a radiotracer. The assays were designed as described previously by Thomas *et al.* (2000) and Javelle *et al.* (2005), and were performed as 'unwashed assays' (Javelle *et al.*, 2005). As a control experiment, a [ $^{14}\text{C}$ ]MA-containing assay buffer was passed over a filter. Then, the radioactivity of the filter (polycarbonate, pore size  $0.2\text{ }\mu\text{m}$ ) was determined. The unspecific binding of [ $^{14}\text{C}$ ]MA to inactivated (heat treated) *N. europaea* cells was also evaluated. Radioactivity was measured by liquid scintillation counting (BETAmatic BASIC counter, Kontron Analytical, Münchenstein, Switzerland).

### Production of starved and acetylene-inhibited *N. europaea* cells

To inactivate the AMO completely and irreversibly, acetylene was added (Hyman & Wood, 1985) to the cell suspension for about 10 min. Then, the cells were washed twice with 5 mM Hepes buffer (pH 7.25). Before the cells were used for MA uptake assays, they were prepared as follows: 'Fresh cells', no treatment; 'acetylene cells', cells were inhibited with acetylene; 'starved cells', cells were stored for 5 h in an ammonium-free 5 mM Hepes buffer (pH 7.25); and 'starved acetylene cells', cells were inhibited with acetylene and then stored for 5 h in an ammonium-free 5 mM Hepes buffer (pH 7.25). As a control, starvation of the cells was extended to 10 or 20 h. An effect on the MA uptake rates was not detectable.

### Proportion between oxidized and assimilated ammonium

Mineral medium (400 mL) with 10 mM ammonium chloride was inoculated with *N. europaea* ( $10^7\text{ cells mL}^{-1}$ ). Cultures were grown at  $28^\circ\text{C}$  on a rotary shaker (200 r.p.m.). Twice a day, samples were taken to determine the ammonium, nitrite, and protein concentrations as well as the dry

weight. Based on the data, the amount and proportion of the oxidized and assimilated ammonium were calculated.

### Transcription analysis of *rh1*

For mRNA analysis, the total RNA was isolated from *N. europaea* applying the acid phenol method described by Völker *et al.* (1994). After transferring the RNA onto a nylon membrane (slot-blotting,  $10 \mu\text{g slot}^{-1}$ ) and hybridization with digoxigenin-labeled probes (immunochemoluminescence, CDP-Star, Roche, Mannheim), the membrane was exposed to Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Science, England) for 20 min. The signals on the autoradiographs were scanned, densitometrically analyzed, and the background signals and signals for unspecific binding of digoxigenin-labeled probes were subtracted. The expression of the 16S rRNA gene was documented as a reference, and the values for *rh1* were normalized to corresponding values of the 16S rRNA gene.

### Analytical procedures

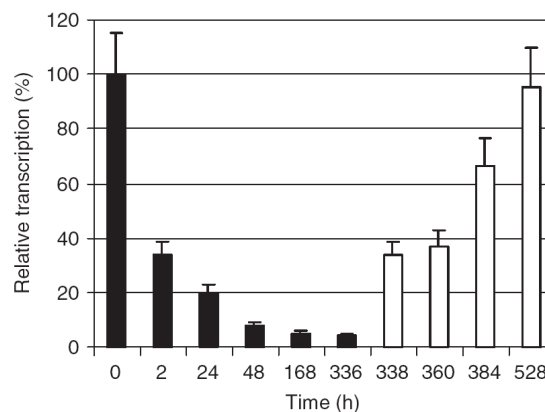
Ammonium was measured according to Schmidt & Bock (1997) (*ortho*-phthaldialdehyde reagent), and nitrite according to van de Graaf *et al.* (1996) (*N*-naphthylethylenediamine-dihydrochloride reagent). Protein was determined according to Bradford (1976). The oxygen concentration in the medium was measured with a Clark-type oxygen electrode. The intracellular concentration of ATP was determined according to Strehler & Trotter (1952) (bioluminescence assays) and the NADH concentration according to Slater & Sawyer (1962) (alcohol dehydrogenase/phenazine methosulfate assay). To measure the dry weight of *N. europaea*, a 20 mL cell suspension was filtered (Nucleopore, pore size  $0.2 \mu\text{m}$ ), dried for 48 h at  $90^\circ\text{C}$ , and the weight difference of the filter was measured. The pH value in the periplasmic space was evaluated with the pH-sensitive dye LysoSensor<sup>TM</sup> Green DND-189 (Molecular Probes Europe BV, Leiden, The Netherlands; fluorescent at pH values below 6).

### Results

In the first experiments, *N. europaea* cells were produced with either down-regulated (denitrifying cells) or unmodified (nitrifying cells) *rh1* expression. Both cell types were applied in the following experiments investigating the ammonium uptake.

### Transcription of *rh1*

The genome of *N. europaea* encodes a single ammonium transporter-like gene (*rh1*). The expression of this gene was about 95% down-regulated in denitrifying cells compared with nitrifying cells (Fig. 1). Variations of the ammonium



**Fig. 1.** Relative transcription levels of *rh1* during denitrification and nitrification. The highest expression signal of *rh1* (0 h) was set to 100. The intensity of the other hybridization signals was calculated in relation to the signal at 0 h. The experiment was inoculated with aerobically precultured *Nitrosomonas europaea* cells and was started under anaerobic growth conditions (0–336 h, black bars). Then, the cell suspension was transferred to aerobic growth conditions (338–528 h, white bars). Results are mean values  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

concentration during aerobic nitrification showed no significant effect on the *rh1* expression. At 0.5, 10, and 50 mM  $\text{NH}_4^+$  (pH 7.4), the relative transcription level of *rh1* was at  $103 \pm 16.8\%$ ,  $102 \pm 8.2\%$ , and  $92 \pm 14.2\%$ , respectively.  $\text{CO}_2$  concentrations in the aeration gas between 0.1% and 5% did not significantly affect the relative transcription level ( $96 \pm 4.7\%$ ).

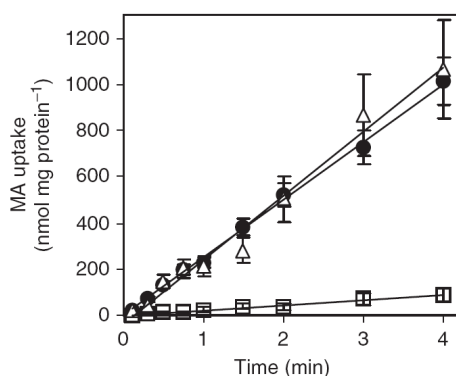
### [<sup>14</sup>C]MA transport in *N. europaea*

The MA transport activities of nitrifying and denitrifying cells (harvested after 528 and 336 h; Fig. 1) were examined to verify whether the different expression of *rh1* resulted in different MA uptake characteristics. The MA uptake rate of the denitrifying cells [ $23.3 \pm 2.2 \text{ nmol (mg protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ] was 10 times lower than that of the nitrifying cells [ $252.7 \pm 50.9 \text{ nmol (mg protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ] (Fig. 2). The addition of 20  $\mu\text{M}$  of the glutamine synthetase (GS) inhibitor L-methionine sulfone (MSF), which had been shown to lead to inhibition of the GS and consequently of the MA uptake by *Escherichia coli* (Javelle *et al.*, 2005), did not affect the MA uptake of *N. europaea* (Fig. 2).

### Effect of ammonium and MA concentrations on the [<sup>14</sup>C]MA uptake

These experiments aimed at measuring the  $K_m$  and  $K_i(\text{NH}_4^+)$  value for the MA uptake of *N. europaea*. The MA concentration giving a half-maximum transport rate at pH 7.25 was  $1.8 \pm 0.2 \text{ mM}$  (Fig. 3a). The  $K_m$  value for the uncharged MA was calculated and was almost constant at about  $1 \mu\text{M}$  independent of the pH value (pH 6.75–8.25).

These results suggest that the uncharged substrate is recognized by the transport system of *N. europaea*. A  $K_m$  value for denitrifying cells could not be determined, because the MA uptake was dominated by passive diffusion of MA into the cells (Fig. 3a). The pH dependency of the MA uptake is shown in Fig. 3b. The uptake rate changed by a factor of about 3 per 0.5 pH units (about factor 10 per pH unit), except for the step from pH 7.75 to 8.25 (only factor 1.5).

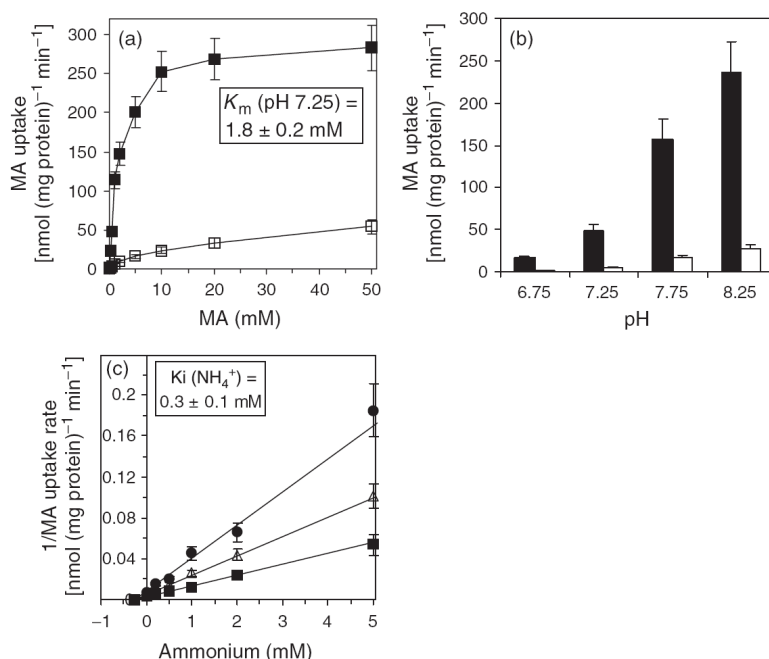


**Fig. 2.** MA uptake of *Nitrosomonas europaea*. The MA concentration in the uptake assay was adjusted to 10 mM, and the cell number was  $5 \times 10^9$  cells mL<sup>-1</sup> [0.8 mg (protein mL<sup>-1</sup>)]. (●) *Nitrosomonas europaea* cells that were precultured under oxic conditions (nitrifying cells), (Δ) as before, but the uptake assay was supplemented with 20 μM L-methionine sulfone (MSF). Also, MSF concentrations of 10, 50, and 100 μM did not affect the MA uptake rate (not shown), (□) cells that were precultured under anoxic conditions (denitrifying cells). Results are mean values  $\pm$  SD ( $n = 5$ ).

The uptake rate of the denitrifying cells was always about 90% lower compared with the nitrifying cells. This strongly favors the suggestion that the uncharged substrate is transported. The diffusion of ammonia, which has a significantly impact on the MA uptake of denitrifying cells, consequently did not significant contribute to the MA uptake of nitrifying *N. europaea* cells. In further experiments, a competition between the transport of ammonium and MA was detectable (Fig. 3c). At the  $K_i$  value, the  $\text{NH}_3$  concentration was about three times lower than the uncharged MA concentration. Hence, the affinity of the transport system for  $\text{NH}_3$  was about three times higher than that for the uncharged MA.

In addition, to the competition of ammonium and MA uptake, an inhibitory effect of MA on the ammonia oxidation activity was observed. At 2 mM  $\text{NH}_4^+$  and 20 mM MA, the ammonia oxidation was completely inhibited after  $142 \pm 3$  min [cell number  $5 \times 10^9$  cells mL<sup>-1</sup> (0.8 mg (protein mL<sup>-1</sup>) at pH 7.25;  $n = 3$ ]. At an increased MA concentration of 250 mM, complete inhibition already occurred after  $22 \pm 2$  min. The internal [<sup>14</sup>C]MA concentrations were calculated on the basis of intracellular radioactivity. The ammonia oxidation activity was always completely inhibited at an internal MA concentration of  $11.4 \pm 3.7$  μmol MA (mg protein)<sup>-1</sup>. To verify these data, the inhibitory effect of MA was examined in crude cell-free extracts of *N. europaea* (0.8 mg protein mL<sup>-1</sup> at pH 7.25;  $n = 5$ ). Applying 12 μmol MA (mg protein)<sup>-1</sup>, complete inhibition was observed within 10 min. Higher MA concentrations resulted in a faster inactivation of the ammonia oxidation activity. At 8 μmol MA (mg protein)<sup>-1</sup>, the

**Fig. 3.** [<sup>14</sup>C]MA uptake kinetics of *Nitrosomonas europaea*. (a) Correlation of MA uptake rate and MA concentration at pH 7.25. (■) Nitrifying *N. europaea* cells. The  $K_m$  value for MA was  $1.8 \pm 0.2$  mM. The  $K_m$  value was pH dependent:  $K_m$  (pH 6.75) =  $5.2 \pm 0.9$  mM,  $K_m$  (pH 7.75) =  $0.61 \pm 0.3$  mM, and  $K_m$  (pH 8.25) =  $0.19 \pm 0.08$  mM, but pH independent at about 1 μM when calculated for uncharged MA concentrations. (□) Denitrifying cells. (b) pH dependence of the MA uptake rate (MA concentration 0.5 mM). Black bars: nitrifying *N. europaea* cells, white bars: denitrifying *N. europaea* cells. (c) Inhibition of the MA uptake by ammonium at pH 7.25 (Dixon plot). The assays were performed at MA concentrations of: (■) 10 mM, (Δ) 5 mM, (●) 1 mM. Results are mean values  $\pm$  SD ( $n = 5$ ).



inhibition remained incomplete at about 90% after 30 min. MA was not oxidized by the AMO, because the inactivation of the ammonia oxidation correlated with a loss of the oxygen consumption.

#### Ammonia transport function of *N. europaea* Rh1 in *S. cerevisiae*

The *N. europaea* Rh1 protein was expressed in a triple *mep*-deficient mutant of *S. cerevisiae* (31019b;  $\Delta\Delta\Delta mep1;2;3$ ). For comparison and as a control, the function of the electrogenic ammonium transporter AtAMT1;1 from the plant *Arabidopsis thaliana* was assayed in parallel (Mayer & Ludewig, 2006). Rh1 of *N. europaea* was able to transport ammonium in *S. cerevisiae* (Fig. 4). The expression of Rh1 improved the growth of the ammonium transporter-deficient *S. cerevisiae* strain at 5 mM ammonium (pH value 5.5), although the growth was slower compared with the AtAMT1;1-transformed control (Fig. 4b). In further experiments, a pH-dependent growth improvement by Rh1 in *S. cerevisiae* strain  $\Delta\Delta\Delta mep1;2;3$  was observed. At pH values of 6.25 and 7.25, but not at 5.25, the growth of *S. cerevisiae*

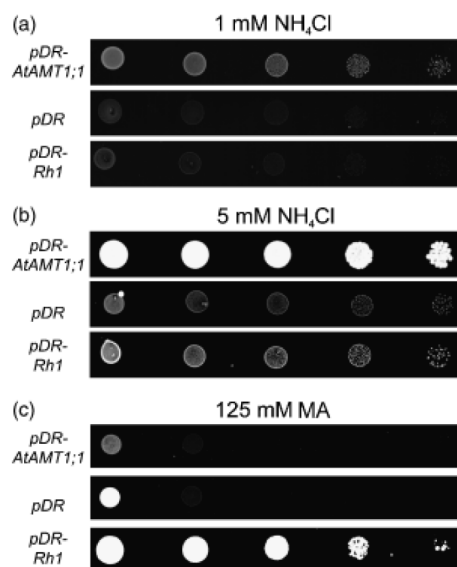
transformed with Rh1 was significantly increased (not shown).

The expression of Rh1 in wild-type *S. cerevisiae* still having its endogenous ammonium transporter mediated resistance against the toxicity of MA (Fig. 4c). *Saccharomyces cerevisiae* wild type with *N. europaea* Rh1 grew significantly faster than the wild type without Rh1 or the wild type expressing AtAMT1;1. This protecting effect may reflect the MA efflux by Rh1 (bi-directional transport characteristics of Rh-type transporter) resulting in a lower internal MA concentration.

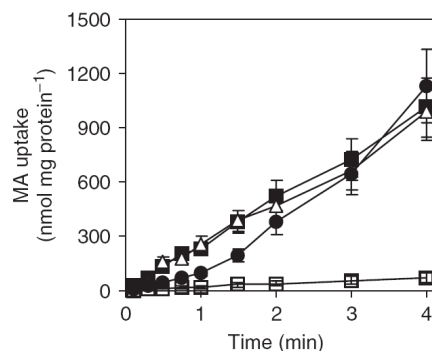
#### Influence of AMO inhibition on the MA uptake of *N. europaea*

During ammonia oxidation, *N. europaea* maintains a membrane potential of about  $-140$  mV (Kumar & Nicholas, 1983), and a pH value between 4.5 and 6 was observed in the periplasmic space (Schmidt *et al.*, 2004a). In inactive *N. europaea* cells (without ammonia oxidation activity), the pH value of the periplasmic space equals the pH value of the surrounding medium. The following experiments were designed to examine whether ammonia oxidation and MA uptake are coupled. At first, the energy status of 'fresh' and 'starved cells', was determined. The ATP and NADH concentration in 'fresh cells' was  $6.9 \pm 0.5$   $\mu\text{mol ATP (g protein)}^{-1}$  and  $8.8 \pm 1.3$   $\mu\text{mol NADH (g protein)}^{-1}$ . In 'starved cells', the ATP and NADH concentrations were as low as  $0.1$   $\mu\text{mol ATP (g protein)}^{-1}$  and  $0.3$   $\mu\text{mol NADH (g protein)}^{-1}$ , respectively.

The [ $^{14}\text{C}$ ]MA uptake rate of the 'acetylene cells' (AMO inhibited) was not significantly different from 'fresh cells' (Fig. 5). In 'acetylene cells' treated with MSF (AMO and GS inhibited), the MA uptake was not reduced (data not



**Fig. 4.** Effect of the expression of Rh1 from *Nitrosomonas europaea* and AtAMT1;1 from *Arabidopsis thaliana* on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. (a, b) Growth of the ammonium transporter-deficient *S. cerevisiae* (31019b; $\Delta\Delta\Delta mep1;2;3$ ) on serial 10-fold dilutions (1–1 : 10 000) of saturated cultures transformed with AtAMT1;1 (pDR-AtAMT1;1), empty pDR199 plasmid (pDR), or Rh1 (pDR-Rh1). The YNB media (pH value 5.5) were supplemented with 1 mM ammonium (a) or 5 mM ammonium (b). (c) Growth of *S. cerevisiae* wild-type strain on serial 10-fold dilutions (1–1 : 10 000) of saturated cultures transformed with AtAMT1;1 (pDR-AtAMT1;1), empty pDR199 plasmid (pDR), or Rh1 (pDR-Rh1). The YNB media (pH value 5.5) were supplemented with 125 mM MA.



**Fig. 5.** [ $^{14}\text{C}$ ]MA uptake by *Nitrosomonas europaea* cells with either active or acetylene inhibited AMO. The MA concentration during the assay was adjusted to 10 mM and the cell number was  $5 \times 10^9$  cells  $\text{mL}^{-1}$  [ $0.8$  mg (protein  $\text{mL}^{-1}$ )]. The pH value in the assay buffer was 7.25. (■) MA uptake of 'fresh cells', (Δ) MA uptake of 'acetylene cells', (●) MA uptake of 'starved cells', (□) MA uptake of 'starved acetylene cells'. Results are mean values  $\pm$  SD ( $n = 5$ ).



shown) and equaled the uptake activity of 'fresh cells' (Fig. 5). The 'starved cells' of *N. europaea* showed a low MA uptake within the first minute, and at the same time the pH value in the periplasmic space declined below pH 6, followed by an increased MA uptake (2–4 min). In contrast, in 'starved acetylene cells', the pH value in the periplasmic space did not decrease, and the [ $^{14}\text{C}$ ]MA uptake rate remained low throughout the whole experiment (Fig. 5).

#### Ammonia oxidation and N-assimilation by *N. europaea*

To evaluate the importance of the ammonium transport for energy conservation and assimilation in *N. europaea*, the maximum ammonia oxidation activity and the ratio of oxidized to assimilated ammonium was determined. At 5 mM ammonium, the maximum ammonia oxidation activity of  $82.3 \pm 5.6 \text{ nmol (mg protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$  was detectable. It remained unchanged when the ammonium concentration was further increased up to 50 mM. During the lag and log phase on average  $99.3 \pm 2.5\%$  of the consumed ammonium were oxidized and about  $1.2 \pm 0.9\%$  were converted into biomass (20 replicated experiments). In the stationary phase, hardly any cell growth or N-assimilation was detectable, although the ammonia oxidation activity remained at about  $48.7 \pm 12.3 \text{ nmol (mg protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

#### Discussion

Ammonium transport in the nitrifying bacterium *N. europaea* was supposed to occur via diffusion over the cytoplasmic membrane (Kleiner, 1981). This suggestion came into conflict with the observation that *N. europaea* accumulates ammonium during ammonia oxidation (Schmidt *et al.*, 2004a). In natural environments, *N. europaea* competes with many bacteria/organisms possessing highly efficient ammonium transport proteins (Marini *et al.*, 2000; Huang & Peng, 2005). AMT ammonium transporters are responsible for the membrane potential-dependent acquisition and accumulation of ammonium (Ludewig *et al.*, 2002, 2003; Mayer *et al.*, 2006). In contrast, the Rh-type transporters equilibrate ammonia across membranes independent of the membrane potential (Westhoff *et al.*, 2002; Ludewig, 2004; Mak *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 2006).

The current study provides evidence that the Rh1 protein of *N. europaea* is a functional Rhesus-type ammonia transporter. First, in transport assays, the MA uptake rate of nitrifying *N. europaea* cells (high transcription level of *rh1*) was about 10 times higher than in denitrifying cells (low transcription level of *rh1*) (Fig. 2). In denitrifying *N. europaea* cells, ammonium is only required for assimilation. As a consequence, the ammonium demand is about 99% lower than in nitrifying cells, and matching with this finding, the transcription rate of the *rh1* gene was about 95%

reduced (Fig. 1). Second, the MA uptake kinetics (Fig. 3a) of nitrifying cells suggested a transporter mediated MA uptake, while the MA uptake of denitrifying cells is obviously dominated by passive diffusion. The MA uptake capacity of Rh1 seems to be saturated at about 20 mM MA (Fig. 3a). The further increase of the MA uptake rate (50 mM MA) is most likely mediated by passive diffusion, because a similar increase was observed for denitrifying cells (Fig. 3a). Third, a competition in the ammonium and MA uptake was detectable (Fig. 3c), also indicating that both substances were taken up via a transport protein. A transport via passive diffusion would not lead to an interaction of the ammonium and the MA uptake. The  $K_m$  values calculated for uncharged MA as a substrate were constant independent of the pH value of the medium, pointing to  $\text{NH}_3$  as the transported compound. Fourth, all properties of Rh1 in yeast (Fig. 4) are similar to other Rh-type proteins, which have been shown to transport ammonia (MA) in an electroneutral manner (Marini *et al.*, 2000; Mayer *et al.*, 2006). The expression of the *rh1* gene in a triple mep-deficient mutant of *S. cerevisiae* resulted in an increased growth of the mutant. Consistent with this result, *S. cerevisiae* growth was enhanced by Rh1 at higher pH values, hinting at  $\text{NH}_3$  as being the transported compound (or  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$  exchange). In ammonia-oxidizing cells of *N. europaea* (pH value of the medium 6.8–8.0), the intracellular pH varies between pH 7 and 8 (Kumar & Nicholas, 1983) and the pH value of the periplasmic space is below 6.0 (this study). The pH optimum for the ammonia oxidation of the AMO is above pH 7 (7.0–7.8) (Suzuki *et al.*, 1974; Schmidt & Bock, 1998), but the hydroxylamine oxidoreductase (HAO) is still active at pH values as low as 5.0 (Frijlink *et al.*, 1992). The HAO is a periplasmic enzyme adapted to the low pH values in the periplasmic space. The high pH optimum of the ammonia oxidation by the AMO provides strong evidence that the ammonia oxidation is located in the cytoplasm (cytoplasmic side of the cytoplasmic membrane), although a location on the periplasmic side was suggested earlier (Hooper *et al.*, 1997).

Different studies have shown that Rh-type transporters equilibrate ammonia across membranes (Westhoff *et al.*, 2002; Ludewig, 2004; Mak *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 2006). The present results would clearly seem to suggest the uncharged MA/ammonia as the transported substrate in *N. europaea*, although the bacterium is known to accumulate ammonium (Schmidt *et al.*, 2004a). While the membrane potential does not primarily influence the equilibration of  $\text{NH}_3$  across a membrane, the pH value in the cell and/or the periplasmic space is crucial to the total MA/ammonium uptake and accumulation. The data of this study show that a low pH value in the periplasmic space is required for a rapid MA (ammonium) uptake (Fig. 5). The inhibitory effect of the MA on the ammonia oxidation

obstructs the acidification of the periplasmic space and consequently impedes the accumulation of MA. Data from earlier studies showed that the protonophor carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine (CCCP), which destroys the pH gradient over the cytoplasmic membrane, inhibits the ammonium uptake of *N. europaea* (Kumar & Nicholas, 1983; Schmidt *et al.*, 2004a). However, the energy status of the cell (NADH, ATP concentration) did not directly correlate with the MA uptake. This study suggests that the pH difference between medium and periplasmic space (the pH value of the periplasmic space was two to three pH units below the pH value of the medium) allows an accumulation of ammonium by an acid  $\text{NH}_4^+$  trap. Such an acid-trap mechanism would allow an accumulation of ammonium by a factor of  $10^2$ – $10^3$  (factor of 10 per pH unit), but is obviously not sufficient to explain the accumulation by a factor of about  $10^4$  reported earlier (Schmidt *et al.*, 2004a). According to the current data, an explanation for this discrepancy cannot be given. Subsequent studies should aim at investigating additional mechanisms that would make possible a further accumulation of ammonium. The increased ammonium concentration in the periplasmic space might initiate or support the Rh1-dependent ammonia uptake of *N. europaea*.

The ammonia uptake capacity seems to be regulated by the cells according to their requirements to generate energy, but not according to the requirements of nitrogen assimilation. First, this is supported by the observation that the ammonium requirement of denitrifying cells is low and the *rh1* gene is only expressed at a low rate (Fig. 1). Second, the inhibition of the glutamine synthetase, a key element controlling the ammonium uptake of *E. coli* (Javelle *et al.*, 2005), has no effect on the MA/ammonium uptake of *N. europaea*. Third, a  $\text{P}_{\text{II}}$ -like protein, regulating the ammonium uptake in other organisms in relation to the requirements for assimilation (Hsieh *et al.*, 1998; Arcondeguy *et al.*, 2001), is not encoded in the genome of *N. europaea* (Chain *et al.*, 2003). Interestingly, the maximum MA/ammonium uptake rate of *N. europaea* was about five times higher than the highest ammonia oxidation activity measured. In natural ecosystems, *N. europaea* has to compete with other (heterotrophic) bacteria for the resource ammonium. The ammonium demand of heterotrophic bacteria for assimilation calculated per cell and time interval is about the same as the ammonium demand of an *N. europaea* cell for assimilation plus energy conservation. Taking into account that many heterotrophic bacteria (for example strains of *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Bacillus*) have shorter generation times and efficient ammonium uptake systems (Siewe *et al.*, 1996; Javelle *et al.*, 2005), one should assume that *N. europaea* loses the competition for ammonium – but as is well known, it does not. It might be speculated that the ability to rapidly take up ammonium and accumulate it

already during the lag phase is part of the strategy of *N. europaea* to compete successfully for the resource ammonium. The overcapacity of the ammonium/MA uptake might explain the high uptake capacity of *N. europaea* compared with other bacteria (Javelle *et al.* 2005). A rhesus-type protein is also coded in the genome of *Nitrospira multiformis*, but is obviously missing in the genome of *Nitrosococcus oceanii* and *Nitrosomonas eutropha*. *Nitrosomonas eutropha* was often found in ammonium-rich environments (Koops *et al.*, 1991), where an ammonium transporter might not be required. Whether the existence of *rh/amtB* in the genome of ammonia oxidizers reflects the concentration of ammonium in the preferred habitat is at the moment speculative. More genomes of ammonia oxidizers have to be checked for the occurrence of these genes to evaluate the importance of ammonium transporters for different ammonia oxidizers.

## References

- Anderson KK & Hooper AB (1983)  $\text{O}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$  are each the source of one O in  $\text{NO}_2^-$  produced from  $\text{NH}_3$  by *Nitrosomonas*;  $^{15}\text{N}$ -NMR evidence. *FEBS Lett* **164**: 236–240.
- Arcondeguy T, Jack R & Merrick M (2001) P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 80–105.
- Bock E, Schmidt I, Stüven R & Zart D (1995) Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch Microbiol* **163**: 16–20.
- Bradford M (1976) Rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Chain P, Lamerdin J, Larimer F *et al.* (2003) Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* **185**: 2759–2773.
- Dua RD, Bhandari B & Nicholas DJD (1979) Stable isotope studies on the oxidation of ammonia to hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Lett* **106**: 401–404.
- Frijlink MJ, Abee T, Laanbroek HJ, de Boer W & Konings WN (1992) The bioenergetics of ammonia and hydroxylamine oxidation in *Nitrosomonas europaea* at acid and alkaline pH. *Arch Microbiol* **157**: 194–199.
- Hooper AB, Vannelli T, Bergmann DJ & Arciero DM (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 59–67.
- Hsieh MH, Lam HM, van de Loo FJ & Coruzzi G (1998) A  $\text{P}_{\text{II}}$ -like protein in *Arabidopsis*: putative role in nitrogen sensing. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13965–13970.
- Huang CH & Peng J (2005) Evolutionary conservation and diversification of Rh family genes and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 15512–15517.



- Hyman MR & Wood PM (1985) Suicidal inactivation and labeling of ammonia monooxygenase by acetylene. *Biochem J* **227**: 719–725.
- Javelle A, Thomas G, Marini AM, Kramer R & Merrick M (2005) In vivo functional characterization of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. *Biochem J* **390**: 215–222.
- Kleiner D (1981) The transport of  $\text{NH}_3$  and  $\text{NH}_4^+$  across biological membranes. *Biochim Biophys Acta* **639**: 41–52.
- Koops H-P, Böttcher B, Möller UC, Pommerening-Röser A & Stehr G (1991) Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov., and *Nitrosomonas halophila* sp. nov. *J Gen Microbiol* **137**: 1689–1699.
- Kumar S & Nicholas DJ (1983) Proton electrochemical gradients in washed cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *J Bacteriol* **154**: 65–71.
- Ludewig U (2004) Electroneutral ammonium transport by basolateral Rhesus B glycoprotein. *J Physiol* **559**: 751–759.
- Ludewig U, von Wirén N & Frommer WB (2002) Uniport of  $\text{NH}_4^+$  by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *J Biol Chem* **277**: 13548–13555.
- Ludewig U, Wilken S, Wu B *et al.* (2003) Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1  $\text{NH}_4^+$  uniporters. *J Biol Chem* **278**: 45603–45610.
- Mak DO, Dang B, Weiner ID, Foskett JK & Westhoff CM (2006) Characterization of ammonia transport by the kidney Rh glycoproteins, RhBG and RhCG. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**: 297–305.
- Marini AM, Soussi-Boudekou S, Vissers S & Andre B (1997) A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**: 4282–4293.
- Marini AM, Matassi G, Raynal V, André B, Cartron JP & Cherif-Zahar B (2000) The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat Genet* **26**: 341–344.
- Mayer M & Ludewig U (2006) Role of AMT1;1 in  $\text{NH}_4^+$ -acquisition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol* **8**: 522–528.
- Mayer M, Schaaf G, Mouro I, Lopez C, Colin Y, Neumann P, Cartron JP & Ludewig U (2006) Different transport mechanisms in plant and human AMT/Rh-type ammonium transporters. *J Gen Physiol* **127**: 133–144.
- Schmidt I & Bock E (1997) Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Arch Microbiol* **167**: 106–111.
- Schmidt I & Bock E (1998) Anaerobic ammonia oxidation by cell-free extracts of *Nitrosomonas eutropha*. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 271–278.
- Schmidt I & Jetten MSM (2004) Anaerobic oxidation of inorganic nitrogen compounds. *Strict and Facultative Anaerobes: Medical and Environmental Aspects* (Nakano MM & Zuber P, eds), pp. 283–303. Horizon Scientific Press, Springer-Verlag.
- Schmidt I, Look C, Bock E & Jetten MSM (2004a) Ammonium and hydroxylamine uptake and accumulation in *Nitrosomonas*. *Microbiology* **150**: 1405–1412.
- Schmidt I, van Spanning RJM & Jetten MSM (2004b) Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and NirK and NorB-deficient mutants. *Microbiology* **150**: 4107–4114.
- Siewe RM, Weil B, Burkovski A, Eikmanns BJ, Eikmanns M & Kramer R (1996) Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **271**: 5398–5403.
- Slater TF & Sawyer B (1962) A colorimetric method for estimating the pyridine nucleotide content of small amounts of animal tissue. *Nature* **193**: 454–456.
- Strehler BLJ & Trotter JB (1952) Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanism. I. Substrate and enzyme determination. *Arch Biochim Biophys* **40**: 28–41.
- Suzuki I, Dular U & Kwok S-C (1974) Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J Bacteriol* **120**: 556–558.
- Tarre S & Green M (2004) High-rate nitrification at low pH in suspended- and attached-biomass reactors. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6481–6487.
- Thomas GH, Mullins JG & Merrick M (2000) Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Mol Microbiol* **37**: 331–344.
- van de Graaf AA, de Bruijn P, Robertson LA & Kuenen JG (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* **142**: 2187–2196.
- Völker U, Engelmann S, Maul B, Riethdorf S, Völker A, Schmid R, Mach H & Hecker M (1994) Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **140**: 741–752.
- Westhoff CM, Ferreri-Jacobia M, Mak DO & Foskett JK (2002) Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter. *J Biol Chem* **277**: 12499–12502.
- Winkler FK (2006) Amt/MEP/Rh proteins conduct ammonia. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* **451**: 701–707.



## VI

Transcription of genes coding for metabolic key functions in *Nitrosomonas europaea* during aerobic and anaerobic growth

**Sonja Beyer, Stefan Gilch, Ortwin Meyer & Ingo Schmidt**

*Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **16**, 187-197  
(2009)

Department of Microbiology, University of Bayreuth, 95447 Bayreuth, Germany

\*Corresponding author.

Tel.: +49 921 552714; fax: +49 921 552727;

E-mail: ingo.schmidt1@uni-bayreuth.

### **Darstellung des Eigenanteils:**

Mein Teil der Arbeit bestand aus der Fermentation von nitrifizierenden als auch denitrifizierenden *Nitrosomonas europaea*-Kulturen. Weiterhin trug ich zur Produktion und Analyse der in der Arbeit verwendeten Stickoxide bei. Durch Diskussion und Mithilfe am Versuchsdesign konnte ich ebenfalls signifikant zum Erfolg Arbeit beitragen. Der Eigenanteil beläuft sich auf ca. 30 %.

Verfasst wurde diese Publikation von Dr. Ingo Schmidt.

## Research Article

Journal of  
Molecular Microbiology  
and Biotechnology

J Mol Microbiol Biotechnol 2009;16:187–197  
DOI: 10.1159/000142531

Published online: July 1, 2008

## Transcription of Genes Coding for Metabolic Key Functions in *Nitrosomonas europaea* during Aerobic and Anaerobic Growth

Sonja Beyer · Stefan Gilch · Ortwin Meyer · Ingo Schmidt

Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Bayreuth, Bayreuth, Germany

### Key Words

*Nitrosomonas europaea* · Transcription, adaptation · Anaerobic metabolism · Pyruvate · 2-Oxoglutarate dehydrogenase · Chemoorganotrophic metabolism

### Abstract

*Nitrosomonas europaea* can grow under conditions of chemolithoautotrophic aerobic (oxygen as oxidant) as well as anaerobic [nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) as oxidant] nitrification or chemoorganotrophic anaerobic pyruvate-dependent denitrification. In this study, the adaptation of the transcription (mRNA synthesis/concentration) of *N. europaea* to aerobic and anaerobic growth conditions was evaluated and the transcription of genes coding for metabolic key functions was analyzed: nitrogen and energy metabolism (*amoA*, *hao*, *rh1*, *nirK*, *norB*, *nsc*, *aceE*, *ldhA*, *ppc*, *gltA*, *odhA*, *coxA*), carbon dioxide fixation (*cbbL*), gluconeogenesis (*ppsA*), cell growth (*ftsZ*), and oxidative stress (*sodB*). During aerobic ammonia oxidation the specific activities of ammonia oxidation, nitrite reduction, and the growth rates correlated with the transcription level of the corresponding genes *amoA/hao*, *nirK/norB/nsc*, and *cbbL/ftsZ*. In anaerobically ammonia-oxidizing cells of *N. europaea*, the cellular mRNA concentrations of *amoA*, *hao*, *rh1*, *coxA*, *cbbL*, *ftsZ*, and *sodB* were reduced compared with aerobically nitrifying cells, but the mRNA levels of *nirK*, *norB*, and *nsc* were significantly increased. During anaerobic pyruvate-dependent denitrification, the mRNA abundance of *nirK*, *norB*, *nsc*, *aceE*, *gltA*, and *odhA* was increased, while the concentrations of *amoA*, *hao*, *rh1*, *coxA*, *cbbL*, *ftsZ*, and *sodB* were significantly reduced. Tempera-

ture, pH value, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, O<sub>2</sub>, NO, and NO<sub>2</sub> concentrations had comparatively small effects on the transcription of the studied genes.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

### Introduction

The chemolithoautotrophic oxidation of ammonia is an important process with environmental and economic significance and has been intensively characterized on both the physiological and the molecular level [Anderson and Hooper, 1983; Dua et al., 1979; Rees and Nason, 1966; Watson et al., 1989]. Ammonia oxidizers have been found in many ecosystems like fresh water, salt water, sewage systems, and soils [Prosser, 1989; Watson et al., 1989], on/in rocks and masonry [Mansch and Bock, 1998], in habitats at high temperatures [Egorova and Loginova, 1975], in Antarctic soils [Wilson et al., 1997], in environments with pH values between 4 and 10 [de Boer and Kowalchuk, 2001; Sorokin et al., 2001], and in anoxic environments [Abeliovich and Vonshak, 1992].

Growing in oxic or anoxic environments necessitates an adaptation of the metabolism especially concerning the energy conservation of ammonia oxidizers. With respect to specific activity and growth rate, the most efficient way to conserve energy is the aerobic oxidation of ammonia to nitrite, which is performed by the sequential action of the two enzymes ammonia monooxygenase (AMO) and hydroxylamine oxidoreductase (HAO) [Anderson and Hooper, 1983; Dua et al., 1979; Hooper et al.,

### KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2008 S. Karger AG, Basel  
1464–1801/09/0164–0187\$26.00/0

Accessible online at:  
www.karger.com/mmb

Ingo Schmidt  
Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Bayreuth  
Universitätsstrasse 30  
DE-95447 Bayreuth (Germany)  
Tel. +49 921 552714, Fax +49 921 552727, E-Mail ingo.schmidt1@uni-bayreuth.de

1997; Rees and Nason, 1966]. Interestingly, in the presence of appropriate concentrations of nitrogen dioxide (50–250 ppm in the headspace) or nitric oxide (25–150 ppm in the headspace) the aerobic ammonia oxidation activity and cell growth are significantly increased [Schmidt et al., 2001c; Zart and Bock, 1998; Zart et al., 2000]. It was suggested that NO<sub>2</sub> and NO are involved in the aerobic ammonia oxidation (NO<sub>2</sub> as oxidant at the AMO; NO binds at the AMO and is oxidized to NO<sub>2</sub>). This metabolism was described as NOX cycle [Schmidt et al., 2001a].

*Nitrosomonas europaea* has two more alternatives to conserve energy that supports cell growth. First, *N. europaea* can grow via anaerobic oxidation of ammonia to nitrite with NO<sub>2</sub> as oxidant. Nitrite is the terminal electron acceptor and the denitrification is catalyzed by the nitrite reductase (NirK) and the nitric oxide reductase (NorB) [Schmidt and Bock, 1997; Schmidt et al., 2001a, c]. Molecular nitrogen (N<sub>2</sub>) was shown as end product of the denitrification [Poth, 1986; Schmidt et al., 2004b], but a nitrous oxide reductase has not been identified yet. Nitrosocyanin, a periplasmic red copper protein with homology to plastocyanin, the electron donor copper region of N<sub>2</sub>O reductase, was suspected to be involved in the denitrification of *N. europaea* [Whittaker et al., 2000]. Interestingly, when a high nitrosocyanin concentration is detectable in the cells, the specific denitrification activity is significantly increased [Schmidt et al., 2004a]. Hence, it can be assumed that nitrosocyanin is involved in the N<sub>2</sub>O reduction of *N. europaea*. Second, *N. europaea* can denitrify (nitrite as electron acceptor) under anoxic conditions with pyruvate or lactate as electron donor [Abeliovich and Vonshak, 1992; Bock et al., 1995; Schmidt et al., 2004b]. Pyruvate and lactate are oxidized to carbon dioxide [Schmidt, unpubl. data] and nitrite is reduced to nitric oxide, nitrous oxide, and dinitrogen [Schmidt et al., 2004b]. Pyruvate-dependent denitrification was also shown to serve as an energy source supporting AMO biosynthesis [Hyman and Arp, 1995]. The biochemical pathway in *N. europaea* allowing the utilization of pyruvate for the conservation of energy still remains unidentified, since in nitrifying cells a 2-oxoglutarate dehydrogenase activity was not detectable resulting in an incomplete tricarboxylic acid (TCA) cycle [Hooper, 1969]. For a chemoorganotrophic metabolism a complete TCA cycle is essential and, except 2-oxoglutarate dehydrogenase activity [Hooper, 1969], the presence of the enzyme functions was confirmed.

During aerobic ammonia oxidation CO<sub>2</sub> is used as carbon source [Nicholas and Rao, 1964] and the transcription of *cbb* genes is regulated upon the CO<sub>2</sub> concen-

tration (upregulated at CO<sub>2</sub> limitation) [Wei et al., 2004]. *N. europaea* can also grow chemolithoheterotrophically under oxic conditions with ammonia as energy source and fructose as carbon source [Hommes et al., 2003]. The assimilation of further organic compounds like acetate and pyruvate has also been demonstrated [Martiny and Koops, 1982]. The carbon source during the anoxic pyruvate-dependent denitrification [Schmidt et al., 2004b] has not been identified yet.

The analysis of the transcription profile of *N. europaea* during deprivation of ammonia and carbonate showed that the transcription level of most genes was significantly downregulated and only few, most likely involved in the adaptation to starvation, were upregulated [Wei et al., 2006]. The transcriptional levels of key genes under challenging growth conditions like different oxygen (oxic, anoxic) and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations, pH values, temperatures, or in the presence of nitrogen oxides (NO or NO<sub>2</sub>) have not been extensively studied yet. Growth on different energy sources (ammonia or pyruvate) with different terminal electron acceptors (oxygen or nitrite) should require a transcriptional adaptation of the involved genes. We investigated the adaptation of the expression of energy-harvesting and growth-related genes in *N. europaea* to aerobic and anaerobic chemolithoautotrophic as well as to anaerobic chemoorganotrophic growth conditions. Furthermore, we studied the effect of pH, temperature, ammonium, and nitrogen oxide concentration on the transcription of these genes.

## Results

The expression of genes representing central functions in the metabolism of *N. europaea* was analyzed (table 1): *amoA*, *hao*, and *rh1* represent the aerobic and anaerobic ammonia oxidation and ammonia transport (*rh1* is a rhesus-type ammonia transporter; Weidinger et al. [2007]). *nirK*, *norB*, *nsc*, and *coxA* represent the nitrite- or oxygen-dependent respiration under anoxic or oxic growth conditions, respectively [Abeliovich and Vonshak, 1992; Bock et al., 1995; Schmidt et al., 2004b]. *aceE*, *ldhA*, *ppc*, *gltA*, and *odhA* cover key functions in the utilization of organic compounds as electron donors. The carbon source during anaerobic growth on pyruvate still remains unidentified and the expression of *cbbL* (CO<sub>2</sub> fixation) and *ppsA* (gluconeogenesis from pyruvate) was monitored. *ftsZ* was selected to receive information about cell division supplementing data about the growth rate, and *sodB* served as an indicator for oxidative stress when

**Table 1.** Nucleotide sequence of the applied probes (5'-3' direction)

| Gene        | Function                                       | Gene ID                                   | Nucleotide sequence of the probe                              |
|-------------|--|---|---|
| <i>amoA</i> | ammonia monooxygenase subunit A                | gi_30248947<br>gi_30250003                | a) GACCGAAGAATCCACCTCCAACCAG<br>b) AGACACACCACACACAACGTTGCAC  |
| <i>hao</i>  | hydroxylamine oxidoreductase                   | gi_30248965<br>gi_30249984<br>gi_30250266 | a) CGCTTCCAGGCTCTTACCCATACCG<br>b) TCCGGTTTGC GCGATTCCGCCGCCG |
| <i>rhI</i>  | ammonia transporter, Rh-like protein           | gi_30248465                               | a) CCACGACAGAAATAGCACCACCCAG<br>b) TTATCCAGCACCAGCCACTCATTCA  |
| <i>nirK</i> | nitrite reductase                              | gi_30248928                               | a) CGTAGGCCACATCGGTTTCAACTGC<br>b) GGCTGTTTTGTCTCAGGATTCTCG   |
| <i>norB</i> | nitric oxide reductase                         | gi_30249949                               | a) CAGTTCCCATACCCCTTCCACCCAG<br>b) CGGCACACAAATCACTGCCGCCAC   |
| <i>nsc</i>  | nitrosocyanin, red copper protein              | gi_30248169                               | a) ACGCCTACGATACCACTATTCTCTGA<br>b) GTTCAGGAAGTCATTAAGCAGGCG  |
| <i>aceE</i> | pyruvate dehydrogenase subunit E1              | gi_30248378                               | a) AGCGGCCCCAAACCCATCGAAACAG<br>b) GATCACC AATACGCTGGAAGCCGAA |
| <i>ldhA</i> | D-lactate dehydrogenase                        | gi_30248903                               | a) GACAACCTTAATGAAGCTGTTATTC<br>b) GAAACTCGCTATCTCATCGACAGCA  |
| <i>ppc</i>  | phosphoenolpyruvate carboxylase                | gi_30248603                               | a) GATCGATGAGCCCTACCGGCGTGTA<br>b) GCGGGATGATGTTTACGGTCGAGCG  |
| <i>gltA</i> | citrate synthase                               | gi_30250298                               | a) CAGCGGATTCCGCCGTGATGCGCAC<br>b) CTGATTCTGCATGCAGACCATGAAC  |
| <i>odhA</i> | 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component      | gi_30250299                               | a) TTTTCTTCTGCAGTCATGACTTCGG<br>b) AGCAGGATCAATGGGAAGATGGAAC  |
| <i>coxA</i> | cytochrome c oxidase, subunit I                | gi_30249019                               | a) GCTGCGACGGGTAACAACCAGAAAC<br>b) GTATGTATCCTGCACCTGAATATCT  |
| <i>cbbL</i> | ribulose biphosphate carboxylase, large chain  | gi_30249873                               | a) TTAGCAGCAGCACCAGCAGCGTTAC<br>b) TCTGACAGCCTTGAATCCAAACACA  |
| <i>ppsA</i> | phosphoenolpyruvate synthase                   | gi_30250286                               | a) GTGATCGTATCAGTCAGAAATTATC<br>b) ATATTGTCCAGGCGCGCCCTGAAAC  |
| <i>ftsZ</i> | cell division protein FtsZ:Tubulin/FtsZ family | gi_30249000                               | a) CGGTCATGGGTCTCTGGGATTGTTG<br>b) AAGCCGCTCTGGAAGATCGGGATCA  |
| <i>sodB</i> | manganese and iron superoxide dismutase        | gi_30248874                               | a) GGCTGTAGCCGTGATGATCTGTTCC<br>b) TGCCAATGCCGCCATCACACAATTC  |

Both sets of oligonucleotide probes were applied to determine the transcription intensities of the given genes.

*N. europaea* was grown at different oxygen or nitrogen oxide (NO, NO<sub>2</sub>) concentrations.

#### Biochemical Characterization of the Aerobic and Anaerobic Growth of *N. europaea*

Relevant metabolic activities and growth parameters during aerobic nitrification, anaerobic nitrification with

NO<sub>2</sub> as oxidant, and anaerobic pyruvate-dependent denitrification were investigated in turbidostat cultures. The metabolic features are specified in table 2. The aerobic nitrification is the most efficient metabolic activity of *N. europaea* resulting in the highest growth rate observed in this study. The nitrogen loss (ammonia consumed vs. nitrite produced) was low at about 2%. During anaerobic



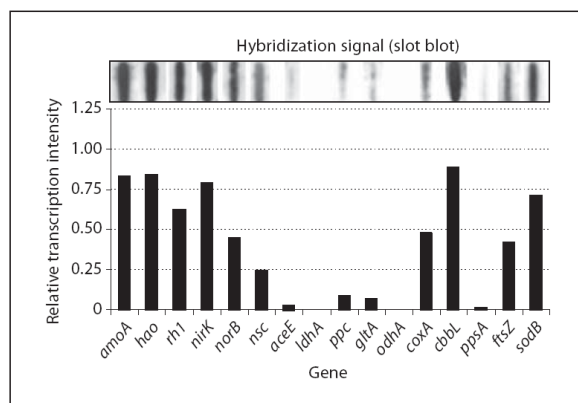
**Table 2.** Characterization of *N. europaea* cells grown under different growth conditions in turbidostat culture

|  | Aerobic nitrification (O <sub>2</sub> ) | Anaerobic nitrification (NO <sub>2</sub> ) | Anaerobic denitrification (pyruvate) | Anaerobic denitrification (lactate) |
|--|---|--|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Ammonia oxidation, $\mu\text{mol/g protein} \times \text{h}$                     | 1,475 $\pm$ 121                         | 114 $\pm$ 10                               | 0.1 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>          | 0.1 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>         |
| Nitrite reduction, $\mu\text{mol/g protein} \times \text{h}$                     | 32 $\pm$ 7                              | 69 $\pm$ 11                                | 42 $\pm$ 7                           | 15 $\pm$ 8                          |
| 2-Oxoglutarate dehydrogenase activity, $\mu\text{mol/g protein} \times \text{h}$ | n.d.                                    | n.d.                                       | 12 $\pm$ 9                           | 5 $\pm$ 3                           |
| Growth rate, h <sup>-1</sup>   | 0.11 $\pm$ 0.03                         | 0.009 $\pm$ 0.002                          | 0.0048 $\pm$ 0.001                   | 0.0022 $\pm$ 0.0015                 |

The specific ammonia oxidation and nitrite reduction activities as well as the growth rates were calculated from turbidostat data (ammonia, nitrite concentration, cell number). To measure the 2-oxoglutarate dehydrogenase activity cells from the turbidostat were harvested and tested offline in a cell-free *N. europaea* extract. Aerobic nitrification (O<sub>2</sub>) = ammonia oxidizing cells grown with oxygen as oxidant; anaerobic nitrification (NO<sub>2</sub>) = ammonia oxidation in the absence of oxygen, but with NO<sub>2</sub> as

oxidant; anaerobic denitrification (pyruvate) = pyruvate-dependent denitrification under anoxic conditions; anaerobic denitrification (lactate) = lactate-dependent denitrification under anoxic conditions; n.d. = not detectable (below 0.5  $\mu\text{mol/g protein} \times \text{h}$ ).

<sup>a</sup> Ammonium was added as nitrogen source. The ammonium consumption equaled the nitrogen requirement for the formation of the biomass.



**Fig. 1.** Hybridization signal and relative transcription intensity of *amoA*, *hao*, *rh1*, *nirK*, *norB*, *nsc*, *aceE*, *ldhA*, *ppc*, *gltA*, *odhA*, *coxA*, *cbbL*, *ppsA*, *ftsZ*, and *sodB* in cells of *N. europaea* during aerobic ammonia oxidation. The transcription intensities (mRNA content) of the selected genes were recorded as absolute values (intensity and size of the hybridization signal). The 16S rRNA hybridization signal was set to 100 and was used as reference signal. The intensities of the other signals were calculated in relation to the 16S rRNA signal. The relative transcription intensities are mean values of six replicated hybridization experiments (three independent turbidostats and two sets of probes). Standard deviation  $\pm 11\%$ .

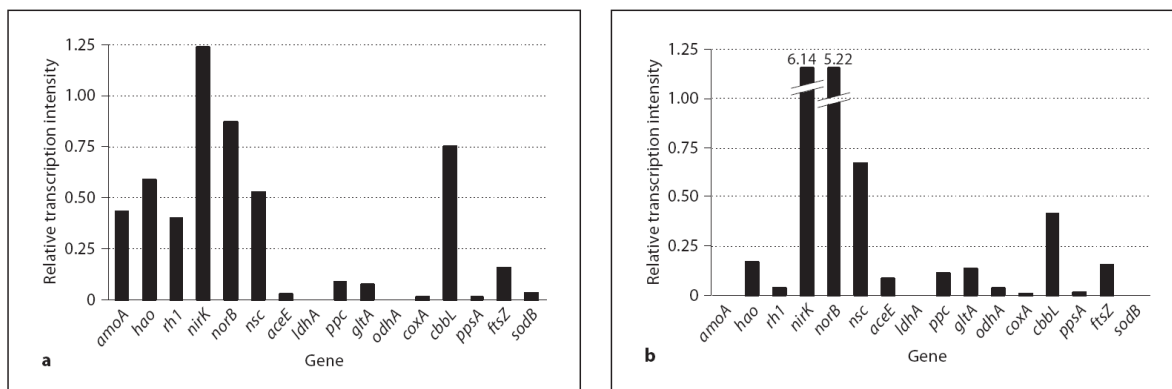
nitrification the ammonia oxidation activity and the growth rate were significantly reduced (about 10 times). Nitrite was used as terminal electron acceptor, and a nitrogen loss of about 60% was detectable. The slowest

growth rate of *N. europaea* was observed during anaerobic pyruvate-dependent denitrification. Most interestingly, in these denitrifying *N. europaea* cells a 2-oxoglutarate dehydrogenase activity was detectable giving evidence for a complete TCA cycle. As an alternative to pyruvate, lactate was successfully tested as a substrate for anaerobic denitrification of *N. europaea* (table 2). The adaptation to different growth conditions was reversible and anaerobically grown cells could be retransferred to oxidic growth conditions.

#### Transcription in Aerobically Nitrifying *N. europaea*

The biomass in the turbidostat was adapted to the aerobic growth conditions for five volume changes and during the following five volume changes, biomass was sampled (one sample per volume change) for transcriptional analysis. In such a sequence of five samples the mRNA abundance of the tested genes never fluctuated more than 15%, proving the stability of the turbidostat culture and the reproducibility of the transcription analysis.

We first studied the transcription of genes (mRNA content) relevant to aerobic nitrification (fig. 1). Strong hybridization signals were detectable for the transcripts of the genes *amoA*, *hao*, *rh1*, *coxA*, and *cbbL*. Under aerobic growth conditions, the corresponding protein functions are required for energy conservation (AMO, HAO), ammonia transport (RH1), and CO<sub>2</sub> fixation (CbbL). An aerobic denitrification activity (table 2), and *nirK*, *norB*, and *nsc* mRNA were detectable. In agreement with a chemolithotrophic metabolism the amount of *aceE*, *ppc*, *gltA*, and *ppsA* transcripts was low, and *odhA* mRNA was



**Fig. 2.** Transcriptional analysis in cells during anaerobic nitrification with  $\text{NO}_2$  as oxidant (**a**) and anaerobic pyruvate-dependent denitrification (**b**). The transcription intensities (mRNA contents) were recorded as absolute values (intensity and size of the hybridization signal). The hybridization signal of the 16S rRNA during aerobic nitrification was used as reference signal (100). The intensities of the other hybridization signals were calculated in relation to the reference signal and plotted in **a** and **b**. The rel-

ative transcription intensities are mean values of six replicated hybridization experiments (three independent turbidostats and two sets of probes). In anaerobically nitrifying cells *ldhA* and *odhA* mRNA was not detectable (**b**). To record the high signals of *nirK* and *norB* the mRNA samples were diluted before the slot blot hybridization. Standard deviation  $\pm 9\%$  (anaerobic nitrification) and  $\pm 15\%$  (anaerobic pyruvate-dependent denitrification).

not detectable. The absence of *odhA* transcript coincides with the results showing a lack of 2-oxoglutarate dehydrogenase activity in aerobically grown *N. europaea* (table 2).

#### Transcription in Anaerobically Growing *N. europaea*

The transcription intensities (mRNA content) of the genes were analyzed in cells during anaerobic nitrification (fig. 2a) and anaerobic pyruvate-dependent denitrification (fig. 2b). The data revealed strong changes in the mRNA level in denitrifying cells and smaller, but sizeable changes in anaerobically nitrifying cells compared with aerobically nitrifying cells (fig. 1).

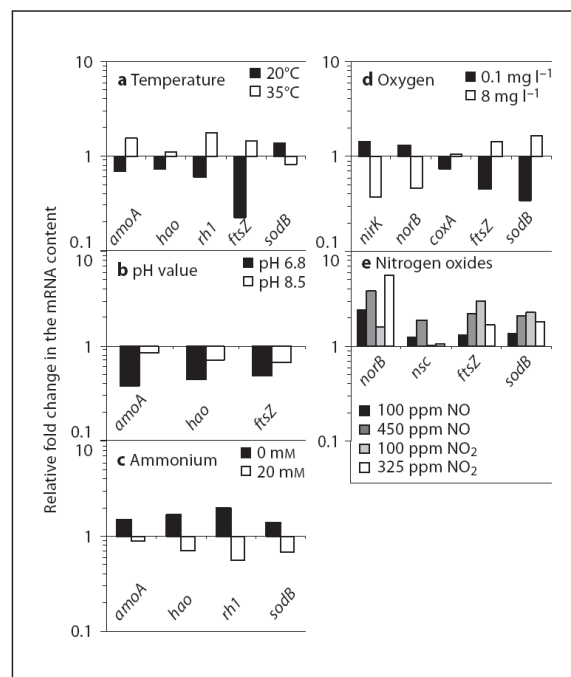
During anaerobic nitrification ammonia serves as electron donor and the bacteria require AMO, HAO, and RH1 for energy conservation. Corresponding to the reduced ammonia oxidation activity of these cells (table 2) the abundance of *amoA*, *hao*, and *rh1* mRNA was slightly reduced (fig. 2a; see fig. 1). Nitrite instead of oxygen was used as terminal electron acceptor and *coxA* mRNA was hardly detectable (fig. 2a). In contrast, the mRNA level of *nirK*, *norB*, and *nsc* (fig. 2a; see fig. 1) and the denitrification activity (table 2) were increased. The amount of *ftsZ* mRNA was low which reflects the significantly reduced growth rate during anaerobic compared to aerobic nitrification (table 2). The low level of *sodB* mRNA

indicates that the replacement of  $\text{O}_2$  by  $\text{NO}_2$  as oxidant for the ammonia oxidation reduced the oxidative stress for *N. europaea*. The amount of *aceE*, *ppc* and *gltA* mRNA remained constant in anaerobically and aerobically nitrifying cells (fig. 1, fig. 2a), and *odhA* mRNA was again not transcribed (fig. 2a).

In denitrifying *N. europaea* cells, ammonia does not serve as an energy source [Schmidt et al., 2004b] and consequently *amoA* mRNA was not detectable and the amount of *rh1* mRNA was very low (fig. 2b). Interestingly, a significant transcription of *hao* was detectable. Ammonia was not oxidized during pyruvate-dependent denitrification and the metabolic function of the HAO under these growth conditions is unknown. The pyruvate-dependent denitrifying cells use nitrite as the terminal electron acceptor [Schmidt et al., 2004b] and the *nirK*, *norB*, and *nsc* transcription intensities were high and the *aceE*, *ppc* and *gltA* mRNA contents were approximately 2-fold increased compared with aerobically nitrifying cells (fig. 2b; see fig. 1). Most interestingly, *odhA* mRNA was detectable in these cells (fig. 2b), thus confirming the presence of a 2-oxoglutarate dehydrogenase activity (table 2). *ldhA* mRNA was not detectable in pyruvate-grown cells, but when lactate was supplied as only carbon source, a low mRNA content was detectable (0.04% of 16S rRNA). In agreement with the low growth rate of denitrifying



**Fig. 3.** Adaptation of the mRNA abundance in aerobically nitrifying *N. europaea* cells grown at different temperatures (**a**), pH values (**b**),  $\text{NH}_4^+$  (**c**),  $\text{O}_2$  (**d**), and NO and  $\text{NO}_2$  (**e**) concentrations. The hybridization intensity (integrated peak area of the densitogram) of an mRNA influenced by the parameters in **a–e** was divided by the intensity of the respective mRNA signal during aerobic nitrification under standard growth conditions. The resulting relative change in the transcription intensity is shown in **a–e**. Only mRNAs whose content fluctuated more than 25% are shown. When the mRNA content of a gene fluctuated less than 25% compared with the expression of this mRNA under standard growth conditions (fig. 1) the deviation was statistically not significant and the transcription of the gene was judged to be stable. All data are mean values of six replicated hybridization experiments (three independent turbidostats and two sets of probes). Standard deviation  $\pm 12\%$ . Standard growth condition: *N. europaea* cells were grown aerobically with ammonia as substrate as described in Experimental Procedures; Nitrifying Cells (fig. 1). The ammonium concentration in the turbidostat was  $5 \pm 2$  mM (25 mM in the reservoir medium), dissolved oxygen concentration  $5 \pm 0.2$  mg/l, temperature  $28^\circ\text{C}$ , pH value 7.4, and nitrogen oxides were not added. The fermentations shown in **a–e** were performed with the same settings, only the parameter indicated (temperature, pH value,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{O}_2$ , NO, or  $\text{NO}_2$  concentration) was modified. To adjust the ammonium concentration in the turbidostat the concentration in the reservoir was reduced to 19 mM  $\text{NH}_4^+$  (0 mM in the turbidostat with a detection limit of 10  $\mu\text{M}$ ) or increased to 40 mM  $\text{NH}_4^+$  (about 20 mM in the turbidostat).



cells, the *ftsZ* mRNA abundance was low (fig. 2b). *sodB* and *coxA* mRNA were not detectable, reflecting the absence of oxidizing agents ( $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2$ ) and, therefore, the absence of oxidative stress. Another interesting finding is a reduced, but still high *cbhL* mRNA content in pyruvate-dependent denitrifying cells (fig. 2b; see fig. 1), while the *ppsA* mRNA content remained unchanged. This observation might point towards  $\text{CO}_2$  as carbon source. Control experiments in a  $\text{CO}_2$ -free atmosphere resulted in a reduced growth rate of about  $2.1 \times 10^{-3}/\text{h}$  ( $4.8 \times 10^{-3}/\text{h}$  in the presence of  $\text{CO}_2$ ; table 2).

#### Transcription in *N. europaea* Grown under Various Aerobic Growth Conditions

These experiments aimed at determining the effects of temperature (20 and  $35^\circ\text{C}$ ), pH value (pH 6.8 and 8.5),  $\text{NH}_4^+$  (0 and 20 mM in the turbidostat), NO (100 and 450 ppm in the aeration gas),  $\text{NO}_2$  (100 and 325 ppm in the aeration gas), and  $\text{O}_2$  concentration (0.1 and 8 mg/l in the medium of the turbidostat) on the transcription intensities of the selected genes in aerobically nitrifying *N. europaea*. The bacteria were grown in turbidostat as described above, but one of the mentioned parameters was varied. The relative abundance of mRNAs that fluctuated

significantly [relative change above 25% compared with cells grown under aerobic 'standard growth conditions' (fig. 1)] is shown in figure 3. Interestingly, in turbidostat culture the maximum ammonia oxidation activity ( $2,437 \pm 218 \mu\text{mol/g protein} \times \text{h}$ ) and growth rate ( $0.21 \pm 0.04/\text{h}$ ) were detectable at  $35^\circ\text{C}$  accompanied by an increased *amoA*, *hao*, *rh1*, and *ftsZ* mRNA content (fig. 3a). This temperature optimum was surprisingly high, since in batch culture, the temperature optimum was between 25 and  $30^\circ\text{C}$  [Watson et al., 1989]. Temperatures above  $37^\circ\text{C}$  resulted in a rapid inactivation of *N. europaea* (neither ammonia oxidation nor growth detectable; not shown). Reduced temperature led to a reduced expression of the energy-harvesting-related genes *amoA*, *hao*, *rh1*, and the growth-related gene *ftsZ* (fig. 3a). A corresponding decline of the ammonia oxidation activity to  $724 \pm 122 \mu\text{mol/g protein} \times \text{h}$  and growth rate to  $0.05 \pm 0.03/\text{h}$  was detectable. The *sodB* mRNA content was increased in *N. europaea* in the presence of high oxidant concentrations ( $\text{O}_2$ , NO,  $\text{NO}_2$ ; fig. 3d, e) and in cells with low ammonia oxidation activity ( $20^\circ\text{C}$ , 0 mM ammonium; fig. 3c). A low ammonia oxidation activity is related to low oxygen consumption and an increased internal  $\text{O}_2$  concentration. It seems possible that such a high internal

O<sub>2</sub> concentration leads to oxidative stress and finally to an elevated *sodB* mRNA abundance.

Growth of *N. europaea* at pH values of 6.8 and 8.5 (optimum at about 7.4) resulted in a significantly reduced expression of *amoA*, *hao*, and *ftsZ* (fig. 3b) as well as in lower ammonia oxidation activities of 430 and 950  $\mu\text{mol/g protein} \times \text{h}$  and growth rates of about 0.018 and 0.05/h, respectively. Ammonia limitation (0 mM ammonium in the turbidostat) resulted in an increased mRNA abundance of *amoA*, *hao*, and *rh1* (fig. 3c). Obviously, *N. europaea* attempted to compensate substrate limitation by an increased production of energy-harvesting-related proteins.

The nitrite reductase has been shown to be constitutively expressed in *N. europaea* [Beaumont et al., 2005]. Nevertheless, at low oxygen concentrations the *nirK* and *norB* mRNA content was increased and the *coxA* mRNA content was reduced (fig. 3d). Partially oxygen was replaced by nitrite as terminal electron acceptor leading to an increased N loss of 15% (at 0.1 mg O<sub>2</sub>/l). As a consequence, less oxygen was used as electron acceptor and therefore less terminal cytochrome c oxidase (CoxA) was required. The addition of appropriate concentrations of NO or NO<sub>2</sub> to the aeration gas led as was expected [Zart and Bock, 1998] to a strong increase of the ammonia oxidation and nitrite reduction activity (table 3), but only the abundance of *norB*, *nsc*, *ftsZ*, and *sodB* mRNA was significantly increased (fig. 3e).

Under the studied aerobic growthy conditions the mRNA content of *aceE*, *ppc*, *gltA*, *cbbl*, and *ppsA* varied less than 25% and, therefore, the expression of those three genes can be considered as stable. Under all tested aerobic growth conditions mRNA of *odhA* was never detectable.

## Discussion

Key enzymes of *N. europaea* such as the AMO, HAO, NirK, and RH1 are constitutively expressed during aerobic ammonia oxidation [Beaumont et al., 2002, 2005; Pinck et al., 2001; Sayavedra-Soto et al., 1996; Stein et al., 2000; Weidinger et al., 2007], but during anaerobic denitrification the concentration of the AMO protein is reduced by more than 95% [Schmidt et al., 2001c; Zart and Bock, 1998; Zart et al., 2000]. AMO and HAO catalyze the aerobic as well as the anaerobic ammonia oxidation [Schmidt and Bock, 1997], and consequently under these growth conditions the *amoA* and *hao* mRNA abundance was high (fig. 1, 2a). During ammonia oxidation the ammonia transporter RH1 is important to supply the bacte-

**Table 3.** Aerobic ammonia oxidation and nitrite reduction activities as well as growth rates of *N. europaea* in turbidostat culture supplied with different concentrations of NO or NO<sub>2</sub>

| NO/NO <sub>2</sub> concentration ppm |     | Ammonia oxidation, $\mu\text{mol/g protein} \times \text{h}$ | Nitrite reduction, $\mu\text{mol/g protein} \times \text{h}$ | Growth rate, $\text{h}^{-1}$ |
|--------------------------------------|-----|--|--|------------------------------|
| – <sup>a</sup>                       | 0   | 1,475 ± 121  | 32 ± 7   | 0.11 ± 0.02                  |
| NO                                   | 100 | 5,104 ± 220  | 1,265 ± 113  | 0.23 ± 0.04                  |
| NO                                   | 450 | 4,190 ± 401  | 1,342 ± 295  | 0.19 ± 0.06                  |
| NO <sub>2</sub>                      | 100 | 1,753 ± 385  | 211 ± 17   | 0.13 ± 0.04                  |
| NO <sub>2</sub>                      | 325 | 570 ± 149  | 17 ± 4   | 0.03 ± 0.01                  |

The dissolved oxygen concentration was maintained at 5  $\pm$  0.2 mg/l and the temperature at 28°C. The pH value was kept constant at 7.4 [20% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>] (n = 3).

<sup>a</sup> Control experiment without NO or NO<sub>2</sub> addition.

ria with sufficient ammonia for energy conservation [Cherif-Zahar et al., 2007; Weidinger et al., 2007] and the *rh1* mRNA content was high during aerobic and anaerobic nitrification (fig. 1, 2a). During anaerobic chemotrophic growth ammonia is not required for energy conservation, but only for assimilation and consequently the *rh1* mRNA content was low (fig. 2b).

Under growth conditions allowing pyruvate-dependent denitrification, ammonia is not used for energy conservation [Bock et al., 1995; Schmidt et al., 2004b], and accordingly the *amoA* mRNA (fig. 2b) and the AMO protein [Schmidt et al., 2001b] were not produced. It is interesting to note the significant abundance of *hao* mRNA in denitrifying cells (fig. 2b), because under these growth conditions, the HAO has no function in the ammonia oxidation pathway (hydroxylamine oxidation) and the reason for transcribing the *hao* mRNA has not been examined yet. The genes *nirK*, *norB*, and *nsc* were constitutively expressed under all growth conditions. Under anoxic conditions, the nitrite reductase and nitric oxide reductase contribute to the energy conservation with nitrite and NO as electron acceptor [Schmidt et al., 2004b] and their mRNA content was increased (fig. 2a, b). A function of nitrosocyanin in the denitrification (N<sub>2</sub>O reduction) is supported by the finding that denitrification activity and *nsc* mRNA content were correlated. Under oxic growth conditions, the denitrification pathway might add to the energy conservation [Zart and Bock, 1998] or nitrite detoxification [Beaumont et al., 2002, 2004].

Pyruvate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and citrate synthase mRNA were detectable

under all growth conditions, but were increased during anaerobic pyruvate-dependent denitrification. During chemolithotrophic growth, both enzymes participate in anaplerotic sequences required for the formation of biomass [Arp et al., 2007; Kronberg, 1966]. The increased transcription of both genes during anaerobic pyruvate-dependent denitrification indicates an increased requirement for the proteins of the TCA cycle. In aerobic and anaerobic nitrifying cells of *N. europaea*, neither *odhA* mRNA nor 2-oxoglutarate dehydrogenase activity was detectable (fig. 1, 2a; table 2). These results correspond to earlier studies by Hooper [1969] that describe a lack of 2-oxoglutarate dehydrogenase activity and give evidence for an incomplete TCA cycle in nitrifying *N. europaea*. Interestingly, *odhA* mRNA and a 2-oxoglutarate dehydrogenase activity were detectable in anaerobic pyruvate-dependent denitrifying *N. europaea* cells (fig. 2b; table 2). The growth supported by pyruvate-dependent denitrification was slow, but the low TCA enzyme activities determined [Hooper, 1969] (table 2) are notwithstanding sufficient to support energy conservation and growth. Transporter for organic compounds is scant in the genome of *N. europaea* [Arp et al., 2007]. As a consequence, the uptake of pyruvate (lactate) might only occur by passive diffusion over the membranes and the low uptake rates may explain the low growth rates.

The *N. europaea* genome codes for a D-lactate dehydrogenase (D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, EC 1.1.1.28, gi\_30248903). Lactate was shown to be an alternative substrate for *N. europaea* and *ldhA* mRNA was only detectable during growth on lactate. In *Corynebacterium glutamicum*, D-lactate dehydrogenase is directly coupled to the respiratory chain (quinones as electron acceptor) and participates in the generation of a proton-motive force [Bott and Niebisch, 2003]. Since the presence of lactate is coupled to growth of *N. europaea* it seems possible that the D-lactate dehydrogenase has a similar function in *N. europaea*.

Under anoxic growth conditions, the abundance of *cbbL* mRNA was hardly reduced. During anaerobic nitrification this reduction was most likely an adaptation to the reduced growth rate of *N. europaea* (table 2). Interestingly, during growth on pyruvate the *cbbL* content also remained on a fairly high level (fig. 2b), although it would have been plausible to expect that its content would be more reduced since pyruvate is a potential substrate for assimilation [Martiny and Koops, 1982]. Furthermore, it is interesting to note that the *ppsA* mRNA content (gluconeogenesis) was hardly increased during anaerobic denitrification. Therefore, it can be assumed that gluconeogenesis

from pyruvate was not significantly enhanced and was not sufficient for biomass production. In this case, carbon dioxide might be necessary as (additional) carbon source for the production of sugar intermediates and biomass and explains the abundance of *cbbL* mRNA (ribulose biphosphate cycle) (fig. 2b). This is further supported by the fact that in a CO<sub>2</sub>-free atmosphere the growth rate of *N. europaea* was reduced. Nevertheless, slow chemoorganoheterotrophic growth on pyruvate in the absence of CO<sub>2</sub> was detectable.

During aerobic nitrification, the adaptation of *N. europaea* on the transcriptional level was less pronounced than switching between oxic and anoxic growth conditions. In general, the mRNA abundance of the energy-harvesting-related genes was correlated with the metabolic activity (ammonia oxidation, denitrification) and growth rate. In turbidostat culture ammonia limitation resulted in an increased abundance of *amoA* and *hao* mRNA and vice versa (fig. 3c). In batch culture a constant *amoA* mRNA content was detectable independent of the ammonia concentration [Stein and Arp, 1998]. A regulation of the AMO and HAO biosynthesis dependent on the substrate concentration seems plausible, since at low ammonia concentrations an increased concentration of AMO and HAO might be necessary to fulfill the requirements of energy conservation. The presence of NO or NO<sub>2</sub> led to an up to 5 times increased ammonia oxidation activity and an about 40 times increased nitrite reduction activity (table 3), but the *amoA*, *hao*, and *nirK* mRNA content did not significantly change (fig. 3e). In this case, the high metabolic activities observed should be caused by a significant increase of the specific enzyme activities (AMO, HAO, NirK). Since the three enzymes are metalloproteins, their catalytic activities are mediated by metal centers and the specific activities depend on their occupancy with metal atoms. Therefore, the determination of the metal content in combination with the measurement of the enzyme activity (enzyme assay) could provide first insight in the modulation of the specific activities. Supplying ammonia oxidizers with NO<sub>2</sub> or NO (NO is oxidized by the cells to NO<sub>2</sub>) provides the AMO with additional oxidant, leading to an increased production of hydroxylamine [NO<sub>x</sub> cycle; Schmidt et al., 2001a]. Because the AMO seems to be the speed-limiting enzyme during the oxidation of ammonia [Hooper et al., 1997; Schmidt and Bock, 1997], an increased hydroxylamine formation (AMO) should result in an increased nitrite formation (HAO), energy conservation, and growth. Supplementing *N. europaea* with NO leads to a strongly increased denitrification activity (table 3) [Zart and Bock, 1998]. The



molecular basis for the induction of the denitrification activity in *N. europaea* by NO has not been evaluated yet. Two possible mechanisms can be discussed. First, NO is responsible for a cumulative induction of the denitrification enzymes in *Pseudomonas fluorescens* [Ye et al., 1992], leading to high denitrification rates. Apposite to this, the *norB*, but not *nirK* transcription in *N. europaea* was found to be upregulated in the presence of NO. Second, NO forms nitrosyl hemoproteins [Henry et al., 1991] resulting in the inhibition of cytochrome oxidases [Carr and Ferguson, 1990]. The inhibition of the terminal cytochrome c oxidase of *N. europaea* by NO might force the bacteria to increase the consumption of nitrite as terminal electron acceptor instead of oxygen. The enhanced denitrification activity in the presence of NO might be caused by a combination of an increased *norB* transcription/biosynthesis and an inhibition of the terminal cytochrome c oxidase. The abundance of *nirK* and *norB* mRNA was influenced by oxygen (fig. 3d). Although both genes were constitutively expressed as reported before [Beaumont et al., 2002], a reduced oxygen concentration led to an increased expression of both genes. This finding corresponds to the increased denitrification activity of *N. europaea* at reduced oxygen concentration [Goreau et al., 1980]. While at low oxygen concentration the *nirK* and *norB* mRNA content was increased, the mRNA content of *coxA* was reduced, and vice versa. Cho et al. [2006] reported an approximately 2.8 times increased *coxA* mRNA content in a *nirK*-deficient *N. europaea* mutant. Most likely, the *nirK*-deficient mutant had to increase the CoxA concentration and the respiration to compensate for the deficiency in denitrification. Together these findings give evidence that oxygen (respiration) and nitrite (denitrification) are both interchangeable terminal electron acceptors in *N. europaea*.

## Experimental Procedures

### Organism and Production of Biomass

*N. europaea* (ATCC 19718) was cultivated in 30-liter laboratory scale reactors (Braun) operated as turbidostat to grow the bacteria under non-nutrient limiting conditions [Bryson and Szybalski, 1952]. In all fermentations the turbidity (optical density at 578 nm) was adjusted to  $0.1 \pm 0.025$  which equaled a cell number of  $2 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$  cells/ml. The turbidity was used as correcting variable controlling the influent pump supplying the fermentor with fresh medium. Different setups were used to produce 'aerobically nitrifying cells' (ammonia oxidation under oxic conditions), 'anaerobically nitrifying cells' (ammonia oxidation under anoxic conditions with NO<sub>2</sub> as oxidant), and 'denitrifying cells' (pyruvate-dependent denitrification under anoxic conditions).

**Nitrifying Cells.** The reactor was operated with mineral medium with 25 mM ammonium [Schmidt and Bock, 1997]. The medium was aerated with air and stirred at 50–200 rpm to maintain a dissolved oxygen concentration of  $5 \pm 0.2$  mg/l. The temperature was kept constant at 28°C, the pH value at 7.4 [20% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>]. The dilution rate of the turbidostat varied between 0.002 (start-up) and about 0.1/h (biomass production).

**Anaerobically Nitrifying Cells with NO<sub>2</sub> as Oxidant.** The reactor was operated with mineral medium, aerated with 5 liters/min of an N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mixture (99.96/0.04%; 0.2 bar overpressure inside the reactor) supplemented with 250 ppm NO<sub>2</sub> (NO<sub>x</sub> analyzer, ECO Physics). The medium was stirred at 250 rpm (temperature 28°C, pH value 7.4). The dilution rate varied between 0.001 (start-up) and 0.01/h (biomass production). The medium reservoir was permanently flushed with 0.2 liter dinitrogen/min to remove atmospheric oxygen. The reservoir vessel was gas-tightly coupled to the reactor and the medium transfer occurred via a peristaltic pump.

**Pyruvate-Dependent Denitrifying Cells.** The reactor was operated with denitrification medium containing 5 mM sodium nitrite, 5 mM sodium pyruvate, and 0.25 mM ammonium chloride as nitrogen source [Bock et al., 1995; Schmidt et al., 2004b]. The observed ammonium consumption corresponded with the nitrogen requirement for assimilation. The turbidostat was aerated with 1 liter/min of an N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mixture (99.92/0.08%; 0.2 bar overpressure inside the reactor) and stirred at 50 rpm (temperature 28°C, pH 6.8). The redox potential of the medium was adjusted between –300 and –200 mV by adding sodium sulfide (Na<sub>2</sub>S) and titanium(III)chloride (TiCl<sub>3</sub>) [Bock et al., 1995]. The dilution rate varied between 0 (start-up) and about 0.005/h (biomass production). The medium reservoir was gas-tightly connected to the reactor and was permanently flushed with 0.2 liter dinitrogen/min (see above).

In order to study the effect of O<sub>2</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations, pH value, and temperature on aerobically nitrifying cells, the following settings were modified operating the turbidostat: in case of growth at different oxygen concentrations, a dinitrogen/air or oxygen/air mixture was applied to maintain 0.1 or 8 mg O<sub>2</sub>/l, respectively. To investigate the effect of NO and NO<sub>2</sub> the aeration gas was supplemented with different concentrations of both gases (NO: 100 and 450 ppm; NO<sub>2</sub>: 100 and 325 ppm). In sterile control experiments the chemical formation of nitrite and nitrate from NO<sub>2</sub> was determined and the nitrite formation was taken into account calculating the nitrite reduction by *N. europaea* (table 3). By adjusting the ammonium concentration in the reservoir medium the concentration in the turbidostat was adjusted to 0 or 20 mM. The effect of the pH value and temperature was studied by maintaining the pH at 6.8, 7.4 or 8.5, and the temperature at 20, 28 or 35°C.

From all turbidostats, samples were taken at regular time intervals and the ammonium, nitrite, protein concentrations, and the 2-oxoglutarate dehydrogenase activities as well as the cell numbers were determined. 24–48 h after changing the growth condition the mRNA contents of the cells already attained the values shown in figures 1–3. Nevertheless, the cells were allowed to adapt for about five volume changes of the turbidostat to make sure that the mRNA content from cells in a steady-state turbidostat was analyzed.

### Analytical Procedures

Ammonium was measured according to Schmidt and Bock [1997] (*o*-phthalaldehyde reagent; SD 0.5%) and nitrite according to Van de Graaf et al. [1996] (N-naphthylethylenediamine dihydrochloride reagent; SD 0.4%). Protein was determined according to Bradford [1976] and the cell number by light microscopy using a Helber chamber (SD 10%). The 2-oxoglutarate dehydrogenase activity was assayed according to Amarasingham and Davis [1965] (reduction of oxidized 3-acetyldiphosphopyridine nucleotide).

### Analysis of Transcription and Image Analysis

For each mRNA analysis,  $1 \times 10^{10}$  to  $5 \times 10^{10}$  *N. europaea* cells were harvested by centrifugation at 4°C and 8,000 g. The total RNA was isolated applying the acid phenol method described by Völker et al. [1994]. After isolation, the concentration and purity of the RNA was determined after 200-fold dilution measuring the absorption in a spectrophotometer at 260 and 280 nm. After transferring the total RNA onto a nylon membrane (slot-blotting, 1–100 µg per slot were applied) and hybridization with digoxigenin-labeled probes (immunochemiluminescence with CDP-Star® according to the manufacturer's instructions, Roche, Mannheim, Germany), the membrane was exposed to Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Science, UK) for 20 min. The signals on the autoradiographs were scanned, densitometrically analyzed (sum of the pixel values were recorded), and background signals as well as signals for unspecific binding of DIG-labeled probes were subtracted. The expression of genes in cells that were grown with significantly different growth rates were analyzed (aerobi-

cally and anaerobically nitrifying, denitrifying cells; table 2). To verify whether these cells have different RNA contents, the total RNA [extinction at 260 nm of 1.0 equals 40 µg RNA/ml; Sambrook et al., 1989] and 16S rRNA contents were determined (hybridization of total RNA samples with probes against 16S rRNA: CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG or GGCTGTCGT-CAGCTCGTGTCTGAG). The total RNA content was:  $360 \pm 45$  µg RNA/mg protein in nitrifying cells,  $335 \pm 33$  µg RNA/mg protein in anaerobically nitrifying cells, and  $281 \pm 41$  µg RNA/mg protein in denitrifying cells. These results were confirmed by hybridizing the total RNA with probes against 16S rRNA, where signals for nitrifying and anaerobically nitrifying cells were not significantly different, but were slightly higher than for denitrifying cells. The signals of the mRNAs of the genes analyzed (table 1) were normalized on the signal of the 16S rRNA under the different growth conditions, respectively. The densitometrically measured hybridization signal of 16S rRNA in aerobically nitrifying cells was set to 100 and was taken as reference to calculate the normalized relative transcription intensity of all genes under the growth conditions studied. The transcription intensity of all genes was evaluated with two oligonucleotide probes (table 1). The determined transcription intensities applying both probes never fluctuated more than 14% for the mRNA of a gene. The given hybridization signals are average values of the repeated application of both probes. The signals of unspecific binding of the probes were obtained by using the total RNA of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* for which complementary sequences to the used probes had been excluded by BLAST search.

### References

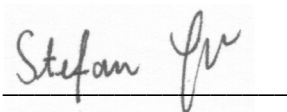
- Abeliovich A, Vonshak A: Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. Arch Microbiol 1992;158:267–270.
- Amarasingham CR, Davis BD: Regulation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase formation in *Escherichia coli*. J Biol Chem 1965;240:3664–3668.
- Anderson KK, Hooper AB: O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O are each the source of one O in NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produced from NH<sub>3</sub> by *Nitrosomonas*; <sup>15</sup>N-NMR evidence. FEBS Lett 1983;164:236–240.
- Arp DJ, Chain PS, Klotz MG: The impact of genome analyses on our understanding of ammonia-oxidizing bacteria. Annu Rev Microbiol 2007;61:503–528.
- Beaumont HJE, Hommes NG, Sayavedra-Soto LA, Arp DJ, Arciero DM, Hooper AB, Westerhoff HV, van Spanning RJM: Nitrite reductase of *Nitrosomonas europaea* is not essential for production of gaseous nitrogen oxides and confers tolerance to nitrite. J Bacteriol 2002;184:2557–2560.
- Beaumont HJ, Lens SI, Reijnders WN, Westerhoff HV, van Spanning RJ: Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea* involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcription repressor. Mol Microbiol 2004;54:148–158.
- Beaumont HJ, Lens SI, Westerhoff HV, van Spanning RJ: Novel *nirK* cluster genes in *Nitrosomonas europaea* are required for NirK-dependent tolerance to nitrite. J Bacteriol 2005;187:6849–6851.
- Bock E, Schmidt I, Stüven R, Zart D: Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. Arch Microbiol 1995;163:16–20.
- Bott M, Niebisch A: The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol 2003;104:129–153.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248–254.
- Bryson V, Szybalski W: Microbial selection. Science 1952;116:43–51.
- Carr GJ, Ferguson SJ: Nitric oxide formed by nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans* is sufficiently stable to inhibit cytochrome oxidase activity and is reduced by its reductase under aerobic conditions. Biochim Biophys Acta 1990;1017:57–62.
- Cherif-Zahar B, Durand A, Schmidt I, Matic I, Merrick M, Matassi G: Evolution and functional characterisation of the RH50 gene from the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. J Bacteriol 2007;189:9090–9100.
- Cho CM, Yan T, Liu X, Wu L, Zhou J, Stein LY: Transcriptome of a *Nitrosomonas europaea* mutant with a disrupted nitrite reductase gene (*nirK*). Appl Environ Microbiol 2006;72:4450–4454.
- De Boer W, Kowalchuk GA: Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. Soil Biol Biochem 2001;33:853–866.
- Dua RD, Bhandari B, Nicholas DJD: Stable isotope studies on the oxidation of ammonia to hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*. FEBS Lett 1979;106:401–404.
- Egorova LA, Loginova IG: Distribution of highly thermophilic, nonsporulating bacteria in the hot springs of Tadzhikistan. Mikrobiologiya 1975;44:938–942.
- Goreau TJ, Kaplan WA, Wofsy SC, McElroy MB, Valois FW, Watson SW: Production of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and N<sub>2</sub>O by nitrifying bacteria at reduced concentration of oxygen. Appl Environ Microbiol 1980;40:526–532.

- Henry Y, Ducrocq C, Drapier J-C, Servent D, Pellat C, Guissani A: Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells. *Eur Biophys J* 1991; 20:1–15.
- Hommes NG, Sayavedra-Soto LA, Arp DJ: Chemolithoorganotrophic growth of *Nitrosomonas europaea* on fructose. *J Bacteriol* 2003;185:6809–6814.
- Hooper AB: Biochemical basis of obligate autotrophy in *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* 1969;97:776–779.
- Hooper AB, Vannelli T, Bergmann DJ, Arciero DM: Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1997;71:59–67.
- Hyman MR, Arp DJ: Effects of ammonia on the de novo synthesis of polypeptides in cells of *Nitrosomonas europaea* denied ammonia as an energy source. *J Bacteriol* 1995;177:4974–4979.
- Kronberg HL: Anaplerotic sequences and their role in metabolism; in Campbell PN, Greville GC (eds): *Essays in Biochemistry*. London, Academic Press, 1966, vol 2, pp 1–32.
- Mansch R, Bock E: Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria. *Biodegradation* 1998;9:47–64.
- Martiny H, Koops H-P: Incorporation of organic compounds into cell protein by lithotrophic, ammonia-oxidizing bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1982;48:327–336.
- Nicholas DJD, Rao PS: The incorporation of labeled CO<sub>2</sub> into cells and extracts of *Nitrosomonas europaea*. *Biochim Biophys Acta* 1964;82:394–397.
- Pinck C, Coeur C, Potier P, Bock E: Polyclonal antibodies recognizing the AmoB protein of ammonia oxidizers of the beta-subclass of the class *Proteobacteria*. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:118–124.
- Poth M: Dinitrogen production from nitrite by a *Nitrosomonas* isolate. *Appl Environ Microbiol* 1986;52:957–959.
- Prosser JJ: Autotrophic nitrification in bacteria; in Rose AH, Tempest DW (eds): *Advances in Microbial Physiology*. London, Academic Press, 1989, vol 30, pp 125–181.
- Rees M, Nason A: Incorporation of atmospheric oxygen into nitrite formed during ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Biochim Biophys Acta* 1966;113:398–401.
- Sambrook J, Fritsch EJ, Maniatis T: *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, ed 2. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sayavedra-Soto LA, Hommes NG, Russell SA, Arp DJ: Induction of ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase mRNAs by ammonia in *Nitrosomonas europaea*. *Mol Microbiol* 1996;20:541–548.
- Schmidt I, Bock E: Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Arch Microbiol* 1997;167:106–111.
- Schmidt I, Bock E, Jetten MSM: Ammonia oxidation by *Nitrosomonas eutropha* with NO<sub>2</sub> as oxidant is not inhibited by acetylene. *Microbiology* 2001a;147:2247–2253.
- Schmidt I, Steenbakkers PJM, op den Camp HJM, Schmidt K, Jetten MSM: Physiologic and proteomic evidence for a role of nitric oxide in biofilm formation by *Nitrosomonas europaea* and other ammonia oxidizers. *J Bacteriol* 2004a;186:2781–2788.
- Schmidt I, van Spanning RJM, Jetten MSM: Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and NirK- and NorB-deficient mutants. *Microbiology* 2004b;150:4107–4114.
- Schmidt I, Zart D, Bock E: Effects of gaseous NO<sub>2</sub> on cells of *Nitrosomonas eutropha* previously incapable of using ammonia as an energy source. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001b;79:39–47.
- Schmidt I, Zart D, Bock E: Gaseous NO<sub>2</sub> as a regulator for ammonia oxidation of *Nitrosomonas eutropha*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001c;79:311–318.
- Sorokin D, Tourova T, Schmid M, Wagner M, Koops H-P, Kuenen JG, Jetten MSM: Isolation and properties of obligately chemolithotrophic and extremely alkali-tolerant ammonia-oxidizing bacteria from Mongolian soda lakes. *Arch Microbiol* 2001;176:170–177.
- Stein LY, Arp DJ: Ammonium limitation results in the loss of ammonia-oxidizing activity in *Nitrosomonas europaea*. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:1514–1521.
- Stein LY, Sayavedra-Soto LA, Hommes NG, Arp DJ: Differential regulation of *amoA* and *amoB* gene copies in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol Lett* 2000;192:163–168.
- Van de Graaf AA, de Bruijn P, Robertson LA, Jetten MSM, Kuenen JG: Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 1996;142:2187–2196.
- Völker U, Engelmann S, Maul B, Riethdorf S, Völker A, Schmid R, Mach H, Hecker M: Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 1994;140:741–752.
- Watson SW, Bock E, Harms H, Koops H-P, Hooper AB: Genera of ammonia-oxidizing bacteria; in Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1989, pp 1822–1834.
- Wei X, Sayavedra-Soto LA, Arp DJ: The transcription of the *cbb* operon in *Nitrosomonas europaea*. *Microbiology* 2004;150:1869–1879.
- Wei X, Yan T, Hommes NG, Liu X, Wu L, McAlvin C, Klotz MG, Sayavedra-Soto LA, Zhou J, Arp DJ: Transcript profiles of *Nitrosomonas europaea* during growth and upon deprivation of ammonia and carbonate. *FEMS Microbiol Lett* 2006;257:76–83.
- Weidinger K, Neuhäuser B, Gilch S, Ludewig U, Meyer O, Schmidt I: Functional and physiological evidence for a rhesus-type ammonia transporter in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol Lett* 2007;273:260–267.
- Whittaker M, Bergmann D, Arciero D, Hooper AB: Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochim Biophys Acta* 2000;1459:346–355.
- Wilson K, Sprent JI, Hopkins DW: Nitrification in aquatic soils. *Nature* 1997;385:404.
- Ye RW, Arunakumari A, Averill BA, Tiedje JM: Mutants of *Pseudomonas fluorescens* deficient in dissimilatory nitrite reduction are also altered in nitric oxide reduction. *J Bacteriol* 1992;174:2560–2564.
- Zart D, Bock E: High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO<sub>2</sub> or NO. *Arch Microbiol* 1998;169:282–286.
- Zart D, Schmidt I, Bock E: Significance of gaseous NO for ammonia oxidation by *Nitrosomonas eutropha*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000;77:49–55.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Stefan Gilch', is written over a horizontal line.

Stefan Gilch

Bayreuth, 28. Juli 2009







